

# Struktur-Funktionsbeziehung einer lichtgetriebenen Protonenpumpe aus *Coccomyxa subellipsoidea*

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Roman Fudim, M.Sc.

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin: Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät: Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter:     1. Prof. Dr. Peter Hegemann  
                  2. Prof. Dr. Athina Zouni  
                  3. Prof. Dr. Peter Hildebrandt

Datum der Einreichung:     23.07.2018

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2018



*No matter what you look at, if you look at it closely enough, you are involved  
in the entire universe.*

- Michael Faraday





# Abstract

Bacteriorhodopsin is the prototype of light-driven proton pumps. Since its discovery in purple membranes of archaea in 1971, it has been extensively studied by spectroscopic and structural means and consequently established as a model system for unidirectional proton transport. The poor expression in heterologous systems however, impedes further characterization of single amino acids involved in sustaining the pumping force under controlled membrane potentials. The closely related light-driven proton pump of the unicellular micro algae *Coccomyxa subellipsoidea*, on the other hand, showed robust expression in *Xenopus laevis* oocytes and HEK293 cells, and therefore allowed a comprehensive electrophysiological investigation. The investigation showed that especially conserved residues of the extracellular half are imperative to maintain unidirectional proton transport. However, the wild type (WT) *C. subellipsoidea* rhodopsin (CsR) showed a drastically increased voltage dependency and a decreased dependence on extracellular pH compared to Bacteriorhodopsin, which could not be explained based solely on sequence comparison.

The goal of the present work is to provide further structural and spectroscopic insights into CsR in order to address differences to Bacteriorhodopsin and elucidate distinctions of the active transport of CsR-WT and the passive transport induced by mutations of the extracellular half in a more defined manner. In this study, the crystal structure of CsR-WT was solved with a 2 Å resolution. It displayed a unique configuration of the extracellular half, combining various features of different types of light-driven proton pumps, which cause the high tolerance against external pH changes. Influences of single amino acids within this entangled network on stationary absorption properties and the photocycle have been investigated by mutagenesis and UV/vis-spectroscopy. One distinctive mark of the extracellular half is a unique interaction between the highly conserved Arg83 and a non-conserved Tyr14. Substitution of Tyr14 with a glutamate lead to a novel channel variant, which showed – different to earlier channel-like mutants – almost symmetrical bidirectional photocurrents already under physiological conditions. Further differences within the cytoplasmic half-channel could be potentially attributed to account for the high voltage-dependency. In particular, a non-conserved histidine on the cytoplasmic edge and an isoleucine in close proximity to the retinal Schiff base were resolved, which modulate the pKa values of the proton-donor Asp97 and the retinal Schiff base, respectively. Differences in the configuration of the retinal binding pocket between CsR and Bacteriorhodopsin could explain the observed blue-shift of the absorption spectrum in CsR compared to Bacteriorhodopsin, the absence of dark-adaptation phenomena and the lack in

accumulation of L-intermediate within the photocycle. Mechanistic insights on amino acids of this compartment have been also established by spectroscopic experiments.

The results presented in this work not only clarify the differences between CsR and other light-driven proton pumps, but also provide new findings concerning the “pump-channel-dualism,” which was previously proposed on an electrophysiological basis. The results emphasize, that the role of Arg83 in sustaining unidirectional transport cannot be considered in an isolated fashion. In the future modifications of CsR can be designed based on the crystal structure, which might lead to the establishment of CsR as a model system for proton transfer processes and as a versatile optogenetic tool.

# Zusammenfassung

Das 1971 in Purpurmembranen von Archaea entdeckte Bacteriorhodopsin, stellt den Prototyp lichtgetriebener Protonenpumpen dar und wurde vor allem durch spektroskopische und strukturelle Untersuchungen als Modellsystem für den vektoriellen Protonentransport etabliert. Die schlechte heterologe Expression erschwert jedoch die eindeutige Zuordnung einzelner Aminosäurereste auf die Pumpkraft des Proteins unter kontrollierten Spannungen. Die dem Bacteriorhodopsin nahverwandte lichtgetriebene Protonenpumpe aus der einzelligen Mikroalge *Coccomyxa subellipsoidea* hingegen, zeigte eine robuste Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293-Zellen und erlaubte so eine umfassende elektrophysiologische Charakterisierung. Dabei konnte dargelegt werden, dass vor allem konservierte Reste der extrazellulären Hälfte für den Erhalt des unidirektionalen Protonentransportes unerlässlich sind. Weiterhin zeigte der Wildtyp (WT) des *C. subellipsoidea* Rhodopsins (CsR) eine gegenüber Bacteriorhodopsin drastisch erhöhte Spannungsabhängigkeit und eine erniedrigte Abhängigkeit vom extrazellulären pH, die auf Grundlage des Sequenzvergleiches nicht eindeutig zu erklären waren.

In der vorliegenden Arbeit sollte die lichtgetriebene Protonenpumpe CsR daher weitergehend strukturell und spektroskopisch untersucht werden, um Unterschiede zu Bacteriorhodopsin zu adressieren und die mechanistische Unterscheidung zwischen dem aktiven Transport des WT und den durch Mutationen der extrazellulären Hälfte bedingten passiven Transportprozessen genauer definieren zu können. Dabei konnte eine Kristallstruktur des WT Proteins mit 2 Å Auflösung gewonnen werden. Diese zeigte eine einzigartige Konfiguration der extrazellulären Hälfte auf, die Merkmale verschiedener Typen lichtgetriebener Protonenpumpen vereint und die für die hohe Toleranz gegenüber Änderungen des extrazellulären pH verantwortlich sein können. Einflüsse einzelner Aminosäuren dieses hochgradig verstrickten Segmentes auf stationäre Absorptionseigenschaften und den Photozyklus wurden auf Grundlage von Mutagenesestudien UV/vis-spektroskopisch evaluiert. Ein besonderes Merkmal der extrazellulären Hälfte liegt in der Wechselwirkung zwischen dem hochkonservierten Arg83 und dem nichtkonservierten Tyr14. Die Substitution des Tyr14 mit Glutamat resultierte in einer neuartigen Kanalmutante, die bereits unter physiologischen Bedingungen nahezu symmetrische bidirektionale Ströme zeigte, was in früheren Kanalmutanten so nicht realisiert werden konnte. Des Weiteren konnten Unterschiede im zytoplasmatischen Halbkanal

identifiziert werden, die möglicherweise für die hohe Spannungsabhängigkeit verantwortlich sind. Insbesondere ein nicht-konserviertes Histidin an der zytoplasmatischen Grenzfläche und ein Isoleucin in räumlicher Nähe zur Retinal-Schiff-Base, sind an der Modulation der  $pK_s$ -Werte des Protonendonors Asp97 und der Retinal-Schiff-Base beteiligt. Unterschiede in der Konfiguration der Retinalbindetasche zwischen Bacteriorhodopsin und CsR, konnten die in CsR gegenüber Bacteriorhodopsin beobachtete Blauverschiebung des Absorptionsspektrums, das Ausbleiben von Dunkeladaptationsphänomenen, sowie die fehlende Akkumulation eines L-Intermediates im Verlaufe des Photozykluses erklären. Auch hierbei wurde das mechanistische Verständnis einzelner Reste dieses Kompartimentes durch weiterführende spektroskopische Experimente erweitert.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse legen nicht nur markante Unterschiede zwischen CsR und anderen lichtgetriebenen Protonenpumpen offen, sondern vermitteln auch neue Erkenntnisse zu dem elektrophysiologisch beschriebenen „Pump-Kanal-Dualismus“ und betonen, dass die Rolle des Arg83 zum Erhalt des unidirektionalen Protonentransportes nicht isoliert betrachtet werden kann. In Zukunft können auf Grundlage der Kristallstruktur Modifikationen an CsR vorgenommen werden, um es nicht nur als Modellsystem für Protonentransferprozesse, sondern auch als optogenetisches Werkzeug, etablieren zu können.

# Abkürzungsverzeichnis

ACR	anionselektives Kanalrhodopsin
AR	<i>Acetabularia</i> Rhodopsin
Arch-2&3	Archaeorhodopsine aus <i>Halorubrum sodomense</i>
ArchT	Archaeorhodopsin aus <i>Halorubrum</i> TP009
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BLAST	English „ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> “
BR	Bacteriorhodopsin
CsR	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> Rhodopsin
ChR1&2	Kanalrhodopsine aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CCR	Kanalrhodopsin aus Cryptophyceae
CR-3	Cruxrhodopsin-3
DDM	n-Dodecyl $\beta$ -D-maltosid
DMEM	English „ <i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i> “
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung
DR-3	Deltarhodopsin-3
DS	Dunkelzustand
EADS	Englisch „ <i>Evolution-Associated Difference Spectra</i> “
ESR	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> Rhodopsin
EZ	extrazellulär
E17R	<i>Exiguobacterium</i> sp. S17
FTIR	Fourier-transform Infrarotspektroskopie
GR	<i>Gloeobacter</i> Rhodopsin
HEK	English „ <i>Human Embryonic Kidney</i> “
HKR1	Histidin-Kinase-Rhodopsin 1
HR	Halorhodopsin
KR2	<i>Krokinobacter eikastus</i> Rhodopsin 2
LB	Englisch „ <i>Lysogeny Broth</i> “
LCP	kubische Phase aus Englisch „ <i>Lipidic Cubic Phase</i> “
LED	Lichtdiode aus Englisch „ <i>Light Emitting Diode</i> “
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion aus Englisch „ <i>Polymerase Chain Reaction</i> “
PDB	Englisch „ <i>Protein Data Bank</i> “
PR	Proteorhodopsin
PRC	Protonenfreisetzungskomplex
PsaN	PSI-Reaktionszentrumsuntereinheit N
PSI	Photosystem I
RSB	Retinal Schiffssche Base
RSBH <sup>+</sup>	protonierte Retinal Schiffssche Base
RT	Raumtemperatur
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SR	Sensorisches Rhodopsin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
UV	Ultraviolett
vis	sichtbar aus Englisch „ <i>visual</i> “
WT	Wildtyp
XeR	Xenorhodopsin
ZP	zytoplasmatisch

## Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	I
Zusammenfassung.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Rhodopsine.....	1
1.2 Absorptionseigenschaften und Farbverschiebung.....	2
1.3 Mikrobielle Rhodopsine.....	3
1.3.1 Bacteriorhodopsin.....	5
1.3.2 Weitere Lichtgetriebene-Ionenpumpen.....	15
1.3.3 Kanalrhodopsine.....	18
1.4 Optogenetik.....	19
1.5 <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> Rhodopsin.....	20
1.6 Zielstellung der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Geräte/Vektoren/Enzyme.....	23
2.2 Verwendete Geräte/Vektoren/Enzyme.....	25
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	26
2.3.2 Primerdesign.....	27
2.3.3 Agarosegelelektrophorese.....	27
2.3.4 Restriktionsverdau.....	27
2.3.5 Ligation.....	28
2.3.6 Ortsspezifische Mutagenese.....	28
2.3.7 Amplifikation und Isolation.....	29
2.4 Allgemeine mikrobiologische Methoden.....	29
2.4.1 Hitzeschock-Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	29
2.5 Präparation von Bacmid-DNS.....	29
2.5.1 Transformation von <i>DH10Bac</i> <sup>TM</sup> -Zellen.....	29
2.5.2 Analyse rekombinanter Bacmid-DNS.....	30
2.5.3 Isolation von rekombinanter Bacmid DNS.....	31
2.6 Zellkultur und Proteinexpression in verschiedenen Zellsystemen.....	31
2.6.1 <i>Pichia pastoris</i> .....	31
2.6.2 HEK293T.....	33
2.6.3 Sf21.....	35
2.7 Aufreinigung heterolog exprimierter Membranproteine.....	37
2.7.1 Besonderheiten in der Aufreinigung aus <i>P. pastoris</i> .....	37
2.7.2 Solubilisierung der Membranproteine.....	37

2.7.3	Immobilisierte Affinitätschromatographie.....	37
2.7.4	Gel-Permeations-Chromatographie.....	39
2.8	Allgemeine Methoden zur Proteinbiochemie .....	39
2.8.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	39
2.8.2	Western Blot.....	39
2.9	Biophysikalische Methoden .....	40
2.9.1	Spektroskopie .....	40
2.9.2	Schmelzpunktbestimmung mittels Tryptophanfluoreszenz .....	43
2.10	Kristallisation.....	43
2.10.1	Kristallisation über Gasphasendiffusion.....	43
2.10.2	Kristallisation in Lipid-Mesophasen.....	43
2.10.3	Datenaufzeichnung und Strukturanalyse .....	44
2.10.4	Weiterführende Analyse der Kristallstruktur.....	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Expression & Kristallisation .....	46
3.2	Kristallstruktur.....	49
3.2.1	Generelle Kristallarchitektur und Übersicht über die monomere Kristallstruktur .....	49
3.2.2	Extrazelluläre Hälfte.....	52
3.2.3	Retinalbindetasche.....	59
3.2.4	Zytoplasmatische Hälfte .....	63
3.2.5	Oberflächenladungen.....	65
3.3	Spektroskopische Charakterisierung.....	67
3.3.1	CsR-Wildtyp .....	67
3.3.2	CsR-Arg83Gln .....	74
3.3.3	CsR-Arg77Gln .....	79
3.3.4	CsR-Ala56His .....	83
3.3.5	CsR-Ser141Gly .....	86
3.3.6	CsR-Tyr14Phe .....	89
3.4	Strukturbasiertes Design und Erstcharakterisierung neuer Kanalmutanten.....	92
4	Diskussion.....	99
4.1	Biologische Relevanz von CsR.....	99
4.2	CsR-Photozyklus.....	100
4.2.1	Einfluss des PRC auf Protonentransferschritte in CsR.....	107
4.2.2	Protonentransferprozesse in der zytoplasmatischen Hälfte von CsR.....	112
4.3	Mechanistische Unterscheidung aktiver und passiver Protonentransportprozesse.....	116
4.4	CsR als optogenetisches Werkzeug.....	126
4.5	Ausblick.....	130

5	Appendix .....	132
	Literaturverzeichnis .....	135
	Publikationsliste .....	154
	Abbildungsverzeichnis .....	155
	Tabellenverzeichnis .....	157
	Eigenständigkeitserklärung .....	159
	Danksagung .....	161



# 1. Einleitung

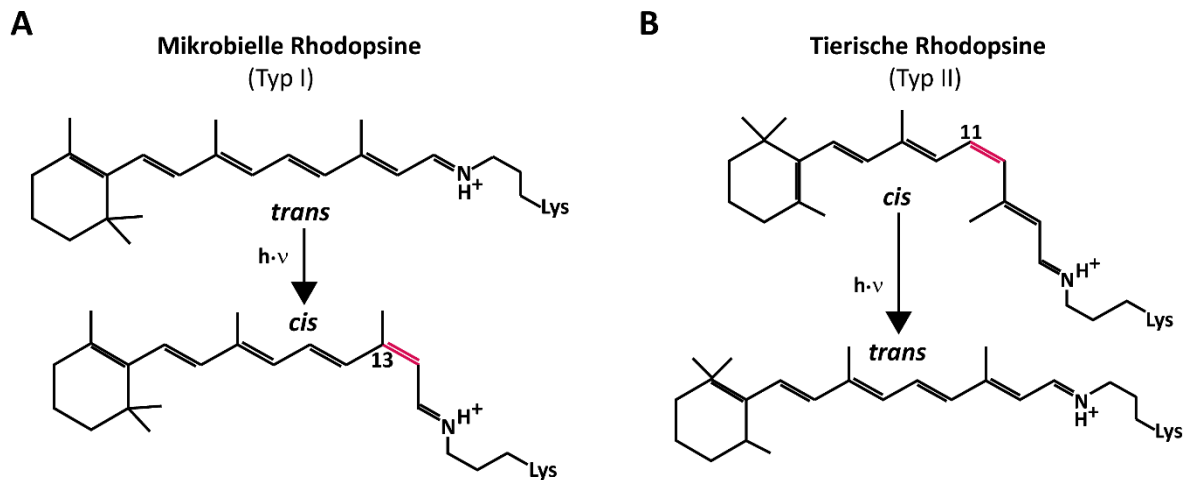
Licht spielt sowohl für photoautotrophe als auch für heterotrophe Organismen als Informations- und Energieträger eine unerlässliche Rolle für das Überleben auf der Erde. Im Zuge der evolutionären Adaptation an verschiedenste Lebensräume und Lebensbedingungen ist eine Vielzahl von lichtsensitiven Proteinen hervorgegangen. Diese so genannten Photorezeptoren absorbieren in distinkten Wellenlängenbereichen des terrestrischen Sonnenspektrums und initiieren enzymatische und zelluläre Prozesse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Struktur-Funktionsbeziehungen des Photorezeptors *Coccomyxa subellipsoidea* Rhodopsin (CsR) aus der antarktischen Grünalge *Coccomyxa subellipsoidea* röntgenkristallographisch und spektroskopisch untersucht. CsR gehört zur Klasse der mikrobiellen Rhodopsine und fungiert als lichtgetriebene Protonenpumpe. Im Folgenden soll zunächst die Proteinklasse der Rhodopsine vorgestellt und eine generalisierte Übersicht über die Funktion verschiedener mikrobieller Rhodopsine gegeben werden. Ein besonderer Fokus wird dabei auf die lichtgetriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin gelegt, die als Modellsystem für aktive Ionentransportprozesse etabliert wurde.

## 1.1 Rhodopsine

Heutzutage sind mehrere tausend verschiedene Rhodopsine bekannt, die sowohl in eukaryotischen, als auch in prokaryotischen Organismen vorkommen (Terakita, 2005). Diese photochemisch reaktiven Proteine bestehen aus einer heptahelikalen Transmembrandomäne und dem Chromophor Retinal. Das Vitamin A-Derivat Retinal ist kovalent über eine Schiff'sche Base (RSB) mit einem konservierten Lysin aus Helix 7 verknüpft. In Anbetracht struktureller und mechanistischer Besonderheiten, unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Rhodopsinen (Ernst *et al.*, 2014). TypI-Rhodopsine wurden in pro- und eukaryotischen Mikroorganismen identifiziert und werden entsprechend auch mikrobielle Rhodopsine genannt. Ihre physiologische Bedeutung wird in Abschnitt 1.3 näher erläutert. TypII- oder tierische Rhodopsine sind eine Untergruppe der so genannten GPCR-Proteinfamilie (Englisch „*G-protein coupled receptor*“) und treten vorrangig in Metazoa auf, wo sie zur visuellen und non-visuellen Signaltransduktion, dem Steuern der zirkadianen Uhr sowie zur Photoisomerisierung genutzt werden (Mackin, Roy and Theobald, 2014). Ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen beiden Rhodopsintypen besteht in dem inkorporierten Retinalisomer. Mikrobielle Rhodopsine binden das all-*trans* Isomer des Retinals, welches nach

Absorption eines Photons zu 13-*cis* isomerisiert (Abb. 1A). Im Gegensatz dazu binden tierische Rhodopsine 11-*cis*-Retinal, das nach Photoaktivierung zu all-*trans* isomerisiert (Abb. 1B).



**Abbildung 1** Isomerisierungsmechanismus mikrobieller (A) und tierischer Rhodopsine (B). Lichtinduzierte Isomerisierung des Retinals von all-*trans* zu 13-*cis* (A) und von 11-*cis* zu all-*trans* (B).

Weiterhin kommt es bei mikrobiellen Rhodopsinen nach Absorption eines Photons zum Durchlaufen eines so genannten Photozykluses. Dieser Reaktionsablauf, der aus mehreren unterscheidbaren Photointermediaten besteht, endet mit dem Wiedererreichen des aktivierbaren Grundzustandes und erlaubt so die repetitive Anregung des Proteins. Ein exemplarischer Photozyklus wird am Beispiel des Bacteriorhodopsins (BR) in Abs. 1.3.1.1 beschrieben. Bei tierischen Rhodopsinen kommt es nach Absorption eines Photons hingegen zur Hydrolyse der RSB und zur Freisetzung des Retinals. Das dissoziierte all-*trans*-Retinal wird im Anschluss enzymatisch durch Isomerasen zum photoaktiven 11-*cis*-Isomer revertiert und vom Apoprotein gebunden, um eine erneute Aktivierbarkeit zu gewährleisten (Jin *et al.*, 2005).

## 1.2 Absorptionseigenschaften und Farbverschiebung

Mit Ausnahme des Xantorhodopsins (XR) aus dem Eubakterium *Salinibacter ruber*, das außer dem Retinal das Carotinoid Salinixanthin als weiteren Cofaktor bindet (Balashov *et al.*, 2005; Luecke *et al.*, 2008), nutzen Rhodopsine exklusiv Retinal als Chromophor. Nichtsdestotrotz zeigen verschiedene Rhodopsine große Unterschiede in ihrer spektralen Auflösung. So sind Menschen in der Lage mithilfe von drei verschiedenen Rhodopsinen einen spektralen Wellenlängenbereich von etwa 380 bis 700 nm aufzulösen (Nathans, Thomas and Hogness, 1985). Diese hohe spektrale Variabilität erreichen Rhodopsine durch die Modulation der unmittelbaren elektrostatischen Umgebung des Retinals. Am deutlichsten wurde dies durch

Experimente an einem modifizierten Retinolbindeprotein II (hCRBP II) demonstriert (Wang *et al.*, 2012). Das neugestaltete Protein war in der Lage all-*trans*-Retinal über eine protonierte Schiff'sche Base (RSBH<sup>+</sup>) kovalent zu binden und erlaubte so, durch zielgerichtete Mutagenese den Einfluss bestimmter Mutanten auf die Farbverschiebung in einer definierten Retinalumgebung zu untersuchen. Während eine bathochrome Verschiebung hierbei auf eine gleichmäßige Verteilung des elektrostatischen Potentials über das ganze Polyen zurückgeführt wurde, wurden die größten hypsochromen Verschiebungen bei Mutationen beobachtet, welche die positive Ladung am Iminium-Ion der RSBH<sup>+</sup> stabilisierten. Eine solche Stabilisierung der RSBH<sup>+</sup> durch entweder einen oder zwei negativ geladene Reste, ist in jedem bekannten Rhodopsin vorhanden (Ernst *et al.*, 2014). Diese negativ geladenen Aminosäuren werden als Gegenionen bezeichnet. Ihre Bedeutung für die Funktionsweise der einzelnen Photorezeptorproteine ist substantiell und wird im Verlauf dieser Arbeit noch thematisiert.

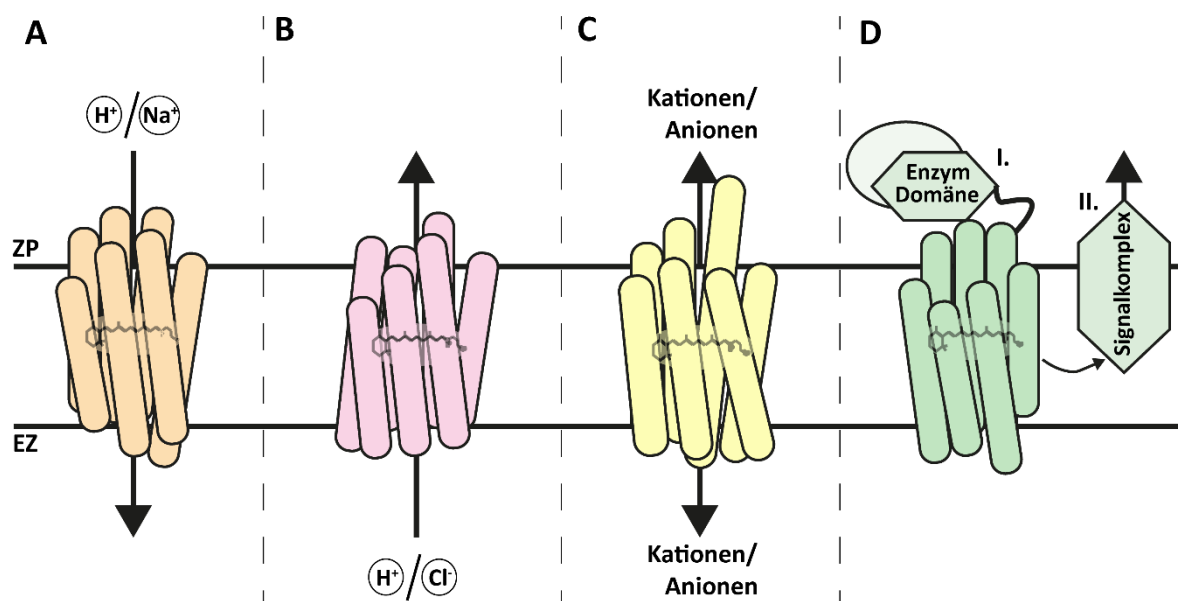
Absorptionsmessungen eines *n*-Butylamin-Retinylidens mit protonierter Schiff'scher Base zeigten ein Absorptionsmaximum bei 610 nm und damit eine rotverschobene Absorption gegenüber gebundenem Retinal in diversen Rhodopsinen (Andersen *et al.*, 2005). Die entsprechende durch die Proteinumgebung induzierte Blauverschiebung des Absorptionsmaximums bezeichnet man dabei als „*opsin shift*“. An dieser Stelle sei erwähnt, dass der „*opsin shift*“ in der Chronologie zuerst als proteininduzierte Rotverschiebung definiert wurde, da die Absorption des gleichen Retinylidens in Methanol referenziert wurde, die ihr Absorptionsmaximum bei 440 nm aufweist (Nakanishi *et al.*, 1980).

### 1.3 Mikrobielle Rhodopsine

Durch Genanalysen wurden bereits über 7000 verschiedene mikrobielle Rhodopsine identifiziert, die in verschiedenen Pro- und niederen Eukaryoten unter den unterschiedlichsten klimatischen Bedingungen in verschiedenen Funktionen auf der ganzen Erde vorkommen (Zhang *et al.*, 2011; Boeuf *et al.*, 2016; Govorunova *et al.*, 2017). Generell kann die Funktionsweise mikrobieller Rhodopsine in zwei Gruppen kategorisiert werden. Die eine Gruppe löst über assoziierte Proteine oder einen C-terminal gekoppelten Effektor zellulär-regulatorische Signale aus, während die andere Gruppe primär die Ladungsverteilung über die Membran moduliert. Eine schematische Übersicht verschiedener mikrobieller Rhodopsine ist in Abbildung 2 dargestellt.

Die sensorischen Rhodopsine I & II (SRI & II) beispielsweise interagieren über nicht-kovalente helikale Wechselwirkungen mit einem membranständigen Signalwandlungskomplex und passen so die Phototaxis halophiler Archaea an verschiedene Lichtverhältnisse

an (Bogomolni and Spudich, 1982; Takahashi *et al.*, 1985). Das nahverwandte sensorische Rhodopsin aus dem filamentösen Cyanobakterium *Anabaena* (ASR) interagiert hingegen mit einem löslichen Signalkomplex und wird wahrscheinlich zur Farbunterscheidung benötigt (Jung, Trivedi and Spudich, 2003; Vogeley *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit der Signalweitergabe in mikrobiellen Rhodopsinen zeigen die kürzlich entdeckten enzymgekoppelten Rhodopsine auf. Diese Rhodopsine vereinheitlichen Sensor- und Effektor-domäne innerhalb eines Proteins, wobei lichtinduzierte Konformationsänderungen des Rhodopsins über helikales Aufwickeln direkt an den C-terminalen Effektor weitergegeben und dieser somit aktiviert wird. Soweit wurden die Rhodopsin-Guanylylzyklase aus dem aquatischen Pilz *Blastocladiella emersonii*, sowie eine rhodopsingekoppelte Phosphodiesterase aus dem Kragengeißeltierchen *Salpingoeca rosetta* funktional beschrieben (Avelar *et al.*, 2014; Scheib *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*, 2017). Eine ähnliche Proteinarchitektur und damit verbundene Funktionsweise wird für das entsprechend benannte Histidin-Kinase-Rhodopsin I (HKR1) aus der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* angenommen. Bisher wurde HKR1 allerdings ausschließlich spektroskopisch charakterisiert (Luck *et al.*, 2012; Luck and Hegemann, 2017). Eine lichtabhängige Kinaseaktivität konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 2** Schematische Übersicht bekannter mikrobieller Rhodopsine: **A** Lichtgetriebene auswärtsgerichtete Protonen- und Kationenpumpen **B** Lichtgetriebene einwärtsgerichtete Protonen- oder Chloridpumpen **C** Lichtaktivierte kation- und anionenselektive Kanäle **D** Lichtaktivierbare sensorische Rhodopsine, die über eine gekoppelte Enzymdomäne verfügen I. oder zur Signalweiterleitung auf einen Signalwandlungskomplex zurückgreifen II. Weitere Details im Text.

Der Transport von Ionen über die Zellmembran ist für alle Organismen unerlässlich. Da die Lipidmembran für Ionen impermeabel ist, bedarf es spezialisierter Proteine, die diesen

Transport katalysieren. Wie oben bereits angedeutet benutzen einige mikrobielle Organismen zu diesem Zweck Rhodopsine. Es wird zwischen zwei Arten des rhodopsinvermittelten Ionentransportes unterschieden. Beim aktiven Transport wird, infolge der photochemischen Aktivierung, ein Ion unidirektional und entgegen dem elektrochemischen Gradienten transportiert. Mikrobielle Rhodopsine, welche diese Art von aktivem Ladungstransport bewerkstelligen, werden entsprechend als lichtgetriebene Ionenpumpen bezeichnet. Beim passiven Transport kommt es zu einer temporären Ausbildung einer Pore durch das Protein, die einen Ionenfluss in Richtung des elektrochemischen Gradienten ermöglicht. Die transportierte Ladungsmenge ist dabei ebenfalls abhängig von der Dauer der Kanalöffnung. Konsequenterweise werden Rhodopsine, welche diese Art des Ionentransportes ermöglichen, als Kanalrhodopsine (ChRs) bezeichnet. ChRs sind kationen- oder anionenselektiv mit jeweils unterschiedlichen Leitfähigkeiten für positiv beziehungsweise negativ geladene Ionen (Schneider, Grimm and Hegemann, 2015; Govorunova *et al.*, 2017). Pumpen hingegen sind unter physiologischen Bedingungen nicht permissiv und transportieren nur ein Ion einer bestimmten Ionensorte pro Photozyklus (Kandori, 2015). Sie werden in Abhängigkeit ihrer Pumprichtung als ein- und auswärtsgerichtete Pumpen unterschieden.

Beide Arten der elektrogenen mikrobiellen Rhodopsine werden in den folgenden Abschnitten näher vorgestellt.

### **1.3.1 Bacteriorhodopsin**

BR wurde bereits vor mehr als vier Dekaden in Purpurmembranen des *Halobacterium salinarum* entdeckt (Oesterhelt and Stoeckenius, 1971). Die Halobakterien nutzen den lichtinduzierten Protonenpumpmechanismus des BR, um einen Protonengradienten an der Membran aufzubauen, der anschließend von ATPasen zur Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) ausgenutzt wird und somit lebensnotwendige energieabhängige Prozesse auch unter niedrigen Sauerstoffbedingungen ermöglicht (Stoeckenius, Lozier and Bogomolni, 1979). Seit der Entdeckung wurde BR umfassend untersucht und bereits in über 45000 Publikationen erwähnt. Durch die entsprechend große Datenlage konnte BR als einfaches Modellsystem zur Untersuchung von Protonentransferprozessen etabliert werden. Überdies trug BR aufgrund der kostengünstigen und simplen Herstellung, sowie der Stabilität des rekombinanten Proteins zur Entwicklung und Etablierung bedeutender experimenteller Techniken und Methoden bei. Unter anderem wurde BR für einige der ersten ultraschnellen zeitaufgelösten spektroskopischen Messungen benutzt (Siebert, Mäntele and Kreutz, 1982; Nuss *et al.*, 1985) und trug sowohl zur Entwicklung der Elektronenmikroskopie, als auch zur Etablierung der Kristallisation in kubischer Phase (LCP, Englisch für „*lipidic cubic phase*“) bei (Henderson and

Unwin, 1975; Landau and Rosenbusch, 1996; Caffrey, 2015).

Entsprechend gut sind sowohl die Struktur, als auch die der Protonentranslokation zu Grunde liegenden photochemischen Prozesse verstanden und sollen in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

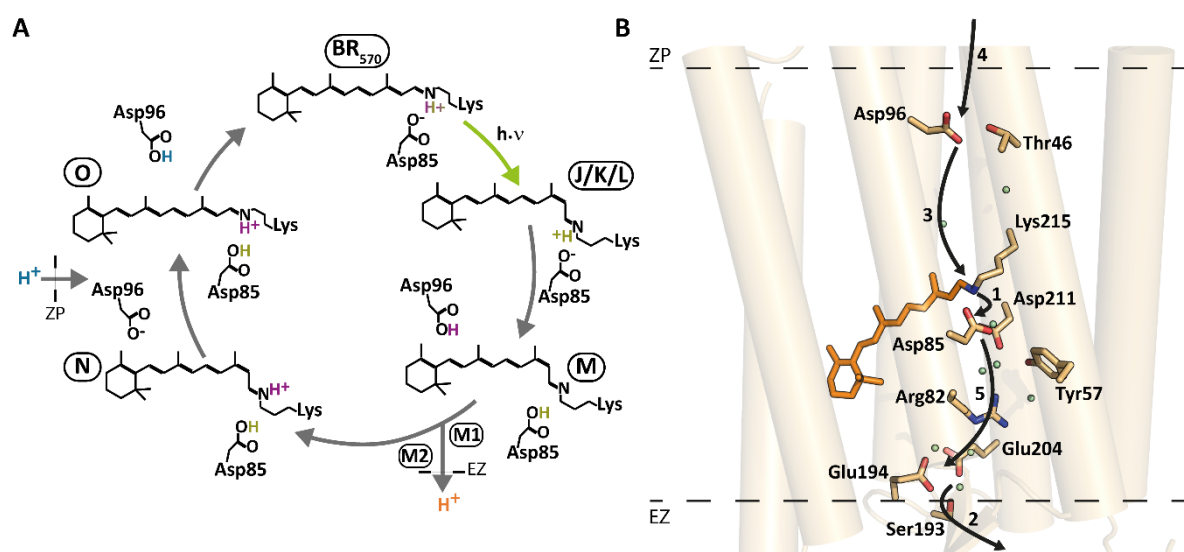
### **1.3.1.1 Photozyklus und Protonentransferreaktionen**

Schon frühe Studien an BR zeigten, dass pro absorbiertem Photon ein Proton aktiv von der zytoplasmatischen (ZP) zur extrazellulären Seite (EZ) transportiert wird und definierten so bereits einen universellen Grundsatz für lichtgetriebene Ionenpumpen (Lozier *et al.*, 1976; Grzesiek and Dencher, 1986). Da dieser Transport gerichtet und wiederholbar ist, muss diesem vektoriellen Pumpvorgang ein Reaktionsmechanismus zugrunde liegen, der sequentiell erfolgt und wieder im initialen reaktiven Zustand endet. Diese Reaktionskaskade wurde, wie in Abs. 1.1 bereits erwähnt, als Photozyklus zusammengefasst.

Dunkeladaptiertes BR besitzt eine heterogene Isomerenkomposition aus all-*trans*,15-*anti*- und 13-*cis*,15-*syn*-Retinal mit protonierter RSB, wohingegen nach Applikation von Licht nur all-*trans*,15-*anti* vorliegt (Maeda, Iwasa and Sakyo-ku, 1977; Harbison *et al.*, 1984; Smith, Lugtenburg and Mathies, 1985; Scherrer *et al.*, 1989). Die Beeinflussung des Isomerenverhältnisses durch Belichtung wird als Lichtadaptation und die Revertierung der im Dunkelzustand existierenden Stöchiometrie als Dunkeladaptation bezeichnet. Da es sich bei der Dunkeladaptation um einen thermischen Prozess handelt der sich über Stunden erstreckt und die Unterscheidung der photochemischen Prozesse ausgehend von beiden koexistierenden Grundzustandsisomeren nicht trivial ist, wurden die meisten Schlussfolgerungen zum Mechanismus des Photozykluses für das lichtadaptierte Protein etabliert. Folglich soll in dieser Einführung der vom all-*trans*,15-*anti*-Retinal ausgehende Photozyklus beschrieben werden, der auch in Abbildung 3 zusammengefasst wird.

Im lichtadaptierten Dunkelzustand liegt die RSB protoniert vor und wird durch das anionische Gegenion Asp85 stabilisiert (Abb. 3A). Da das Absorptionsmaximum dieses Dunkelzustandes bei 570 nm liegt, wird er entsprechend als BR<sub>570</sub> abgekürzt (Oesterhelt and Stoeckenus, 1971). Davon ausgehend durchläuft BR nach Photoaktivierung sechs unterscheidbare Intermediate, die entsprechend der Sequenz als J, K, L, M, N und O benannt wurden. Die Absorption eines Photons adäquater Energie initiiert den Photozyklus und führt zu einer *trans-cis*-Isomerisierung der C13=C14-Doppelbindung des Retinalcofaktors (Oesterhelt, Meentzen and Schuhmann, 1973). Die initiale Isomerisierung verläuft hierbei extrem schnell (300-500 fs), wonach bereits der erste elektronische Grundzustand J auftritt

(Dobler *et al.*, 1988; Herbst, Heyne and Diller, 2002; Schenkl *et al.*, 2006; Nogly *et al.*, 2018). Das J-Photointermediat zeigt eine zu 625 nm bathochrom verschobene Absorption. Spektroskopische Subpicosekunden-Resonanz-Raman-Messungen deuteten dabei auf eine Verdrehung der Polyenkette des Retinals im J-Intermediat hin (van den Berg *et al.*, 1990), die kürzlich durch zeitaufgelöste kristallographische Untersuchungen bestätigt werden konnte (Nogly *et al.*, 2018). Obwohl J bereits den elektronischen Grundzustand darstellt, handelt es sich dabei um eine Schwingungsmode höherer Ordnung (Englisch „*hot band*“), die durch Schwingungskühlung (Englisch „*vibrational cooling*“) innerhalb von 3 – 5 ps in das K-Photointermediat zerfällt (Polland *et al.*, 1986; Nogly *et al.*, 2018).



**Abbildung 3** A Vereinfachtes Modell des Photozyklus von BR mit den im Text beschriebenen Intermediaten. Gezeigt sind die jeweiligen Retinalisomere, sowie Protonierungsgrade des primären Protonakzeptors und -donors in den einzelnen Photointermediaten. Protonen sind farblich markiert. Subskript impliziert Absorptionsmaximum in nm. Lichtinduzierter Photozyklusschritt als grüner Pfeil und thermische Übergänge zwischen den einzelnen Intermediaten als graue Pfeile dargestellt. B Chronologie der Protonentransferschritte innerhalb des BR [PDB: 1C3W] im Laufe des Photozyklus. Beteiligte Reste durch Stäbchenmodell, Wasser durch grüne Kugeln dargestellt. Ungefähre Grenzflächen der Membran durch gestrichelte Linie dargestellt. Detaillierte Ausführung im Text.

Analog zu J, ist auch das K-Intermediat bathochrom gegenüber BR<sub>570</sub> verschoben, mit einer im Differenzspektrum beobachteten Absorption bei 610 nm. Da das K-Intermediat mit  $\tau_K \sim 1,5 \mu s$  um fast zwei Größenordnung langlebiger als J ist, konnte K auch mit spektroskopischen Verfahren geringerer Zeitauflösung sowie bildgebenden Verfahren untersucht werden. Hochaufgelöste Kristallstrukturen des K-Zustandes zeigen keine signifikanten Konformationsänderungen des Proteinrückgrates auf, sodass ein Überschuss an Gibbs-Energie auch hierbei in einer Verdrillung des 13,*cis*-15,*anti*-Isomers des Retinals konserviert wird, um weitere Konformationsänderungen des BR zu katalysieren (Braiman and Mathies, 1982; Edman *et al.*, 1999; Schobert *et al.*, 2002; Nogly *et al.*, 2018). Weiterhin konnte in K eine veränderte Orientierung der Wasserstoffbrückenwechselwirkung zwischen dem

Stickstoffatom der RSBH<sup>+</sup> und einem benachbartem Wasser festgestellt werden, die bereits durch Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) postuliert wurde (Maeda *et al.*, 1991). Die weitere Relaxierung des Retinals und die damit einhergehende Reorientierung des RSBH<sup>+</sup>-Proton-Dipols zur hydrophoben zytoplasmatischen Seite des Proteins erfolgen im L-Intermediat (Nango *et al.*, 2016). Die im L-Intermediat beobachtete verstärkte Wechselwirkung zwischen der RSBH<sup>+</sup> und dem Gegenion Asp85 wird durch die Deformation von Helix3 und damit verbundenen H-Brücken der RSBH<sup>+</sup> mit Thr89 und Wasser452 erklärt und kann durch die beobachtete hypsochrome Verschiebung der Differenzabsorption des Intermediat-spektrums zu 550 nm verdeutlicht werden (Hu *et al.*, 1997; Edman *et al.*, 2004; Nango *et al.*, 2016). Da im Dunkelzustand der pK<sub>s</sub>-Wert der RSBH<sup>+</sup> bei 13,5 und der des Gegenions Asp85 bei 2,6 liegt, ist diese veränderte Geometrie zwingend erforderlich, um die Donor-/Akzeptor-Wechselwirkung der beiden unterschiedlich geladenen Gruppen umzukehren und so die Protontranslokation von der RSB auf das Asp85 zu ermöglichen (Rouso *et al.*, 1995).

Der erste eigentliche elektrogene Schritt, der Protontransfer von der RSBH<sup>+</sup> auf Asp85 erfolgt dann in etwa 50 µs im Übergang vom L- zum M-Intermediat (Abb. 3A,B, Schritt 1; Braiman *et al.* 1991). Da die Deprotonierung der RSBH<sup>+</sup> eine drastische Blauverschiebung der Absorption zu 412 nm bedingt, ist das M-Intermediat absorptionsspektroskopisch eindeutig vom Grundzustand unterscheidbar (Lozier, Bogomolni and Stoeckenius, 1975). Die Deprotonierung der Schiff'schen Base und die damit assoziierte Protonierung des Asp85 induzieren eine Umorientierung des Arg82, infolgedessen die Guanidingruppe zur extrazellulären Seite transloziert. Unter neutralen pH-Bedingungen findet im gleichen Zeitintervall die Freisetzung eines Protons an der extrazellulären Seite statt (Abb. 3B, Schritt 2; Heberle and Dencher, 1992; Petkova *et al.*, 1999; Nango *et al.*, 2016). In Anbetracht dessen, dass Asp85 erst im letzten Schritt des Photozyklus deprotoniert wird (Abb. 3B, Schritt 5), kann es sich bei dem freigesetzten Proton nicht um das Proton der RSB handeln. Entsprechend wurden über Jahrzehnte verschiedene saure und basische Aminosäuren, wie etwa Arg82, Glu194 und Glu204, als potentielle Reste der Protonfreisetzung diskutiert. Weil jedoch kein einzelner Rest zur Protonenfreisetzung eindeutig identifiziert werden konnte, spricht man von der Freisetzung durch den so genannten Protonenfreisetzungskomplex (PRC, Englisch „*proton release complex*“), der sich aus mehreren polaren Resten und komplexierten Wassermolekülen zusammensetzt (Garczarek *et al.*, 2005; vgl. Abb. 4). Das zu abstrahierende Proton ist dabei im Dunkelzustand in einem so genannten Eigen-Kation ([H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>) delokalisiert (Garczarek and Gerwert, 2006). Innerhalb des langlebigen M-Intermediates (3-5 ms) kommt es neben der oben beschriebenen Neukonfiguration von Arg82 zu weiteren konformationellen Änderungen, die zu einer Veränderung der lokalen Zugänglichkeit der RSB führen (Oesterheld, 1998).



Während die RSB im ersten Teil des Photozyklus zum EZ orientiert war, kommt es durch die Deprotonierung zu einer Neuausrichtung der RSB, die zum Verlust der Konnektivität zum EZ führt und die RSB mit der ZP-Hälfte des Proteins verbindet. Entsprechend werden zwei, die jeweilige Konfiguration repräsentierende M-Subintermediate, M1 und M2, unterschieden (Richter, Needleman, *et al.*, 1996). Diese Neukonfiguration des Gegenionkomplexes im M2-Intermediat führt außerdem zu einem Anstieg des  $pK_s$ -Wertes des protonierten Asp85, was eine Reprotonierung der RSB durch den primären Protonakzeptor unwahrscheinlich macht (Richter, Needleman, *et al.*, 1996). Diese intrinsische mechanistische Trennung der räumlichen Zugänglichkeit zur RSB ist entscheidend für die Unidirektionalität des Pumpvorganges und wird als „Protonierungs-Schalter“ oder „Lokales-Zugangs-Modell“ (aus dem Englischen „*protonation switch*“ bzw. „*local access model*“) bezeichnet (L. S. Brown *et al.*, 1998; Leonid S. Brown *et al.*, 1998; Lanyi and Schobert, 2004).

Im M2 zu N Übergang kommt es zur Reprotonierung der RSB durch den primären Protodonator Asp96 (Abb. 3B, Schritt 3). Im Dunkelzustand führt unter anderem die Wasserstoffbrücke zwischen Asp96 und Thr46 zu einem ungewöhnlich hohen  $pK_s$ -Wert des Asp96 von  $\sim 11,5$ , der in diesem Schritt des Photozykluses verringert werden muss, um die Protonierung der Schiff'schen Base ( $pK_s \sim 8$ ) zu ermöglichen (Száráz, Oesterhelt and Ormos, 1994; Brown and Lanyi, 1996). Dabei kommt es im N-Intermediat in dem sonst hydrophoben Hohlraum der zytoplasmatischen Hälfte zu einer Neuordnung von Wassermolekülen und einem Aufbrechen der H-Brücke zwischen Asp96 und Thr46, was in einem Absinken des  $pK_s$ -Wertes von Asp96 auf  $\sim 7,5$  resultiert (Sass *et al.*, 2000; Dioumaev *et al.*, 2001). Das Proton wird daraufhin durch eine sich ausbildende transiente Wasserkette mittels des Grotthuß-Mechanismus auf die 11 Å entfernte RSB übertragen (Freier, Wolf and Gerwert, 2011). Die Deprotonierung von Asp96 führt zu einer partiellen Entriegelung der ZP-Seite, welche die Ausbildung eines Hydratisierungskanals erlaubt über den die anschließende Reprotonierung von Asp96 durch ein Proton aus dem ZP-Medium erfolgt (Wang *et al.*, 2013; Abb. 3B, Schritt 4).

Simultan zur Reprotonierung von Asp96 kommt es auch zu einer Reisoomerisierung des Retinalchromophors. Dieser Prozess markiert den Übergang vom N- zum O-Intermediat (Abb. 3A). Das Retinal ist hierbei immer noch verdreht und relaxiert erst später mit der Deprotonierung von Asp85 vollständig (Smith *et al.*, 1983). Da im O-Zustand Asp85 protoniert vorliegt, wird das positiv geladene Iminiumion der RSB nicht mehr elektrostatisch durch das Gegenion (vgl. Abb. 4) stabilisiert, was in einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums im Differenzspektrum resultiert. Der genaue Mechanismus der Protonentranslokation von Asp85 zum PRC (Abb. 3B, Schritt 5), der durch den Zerfall des O-Intermediates beschrieben werden kann, ist weitestgehend unverstanden. FTIR-Messungen in diesem Zeitbereich suggerieren eine transiente Protonierung des zweiten Gegenions Asp212, die vermuten lässt,

dass das Proton zunächst von Asp85 auf Asp212 übertragen wird, bevor es zum PRC transferiert wird (Dioumaev *et al.*, 1999). Außerdem konnte anhand von Messungen im sauren pH-Bereich gezeigt werden, dass der Protonierungsgrad des PRC die Geschwindigkeit dieses letzten Schrittes maßgeblich beeinflusst (Balashov *et al.*, 1999). In wie weit allerdings weitere wichtige Seitenketten, wie z.B. Tyr57 und Arg82, in diesen Prozess involviert sind, auch welche strukturellen Gegebenheiten diesen Schritt forcieren sowie der genaue Weg des Protons von Asp85 zum PRC bleibt weiterhin unbekannt und erlaubt, so lange keine dazugehörige Kristallstruktur existiert, nur Spekulationen über diesen letzten Schritt des Photozyklus.

Abschließend sei erwähnt, dass der oben beschriebene Photozyklus nur unter pH-Bedingungen von pH 6-9,5 Bestand hat. Photozyklen in davon abweichenden pH-Bedingungen wurden umfassend von S.P. Balashov besprochen (Balashov, 2000) und sollen im Folgenden nur kurz zusammengefasst werden.

In stark-saurem Milieu ( $\text{pH} < 2$ ) liegt Asp85 ( $\text{pK}_s = 2,6$ ) bereits im Dunkelzustand protoniert vor, wodurch die Deprotonierung der Schiff'schen Base nach der Isomerisierung verhindert wird. Somit wird kein M-Intermediat gebildet und das Retinal reisomerisiert thermisch in das all-*trans*-Isomer zurück. Dabei findet keine Protonenabgabe an das extrazelluläre Medium statt.

Liegt der pH oberhalb von 2 aber unterhalb des  $\text{pK}_s$ -Wertes des PRC im M-Intermediat ( $\sim 5,8$ ) kommt es zu einer verzögerten Protonenfreisetzung ins extrazelluläre Medium. Anstatt im Übergang von M1 nach M2 wird das Proton dann erst beim Übergang von O zum Dunkelzustand freigesetzt und erfolgt somit erst mit der Deprotonierung des Asp85 und nach der Aufnahme eines Protons aus dem zytoplasmatischen Medium.

In stark-alkalischem Milieu ( $\text{pH} > 9,5$ ) liegt der PRC bereits im Dunkelzustand deprotoniert vor und es findet trotz starker Anreicherung des M-Intermediates keine schnelle Protonenabgabe mehr statt.

### **1.3.1.2 Struktureller Aufbau**

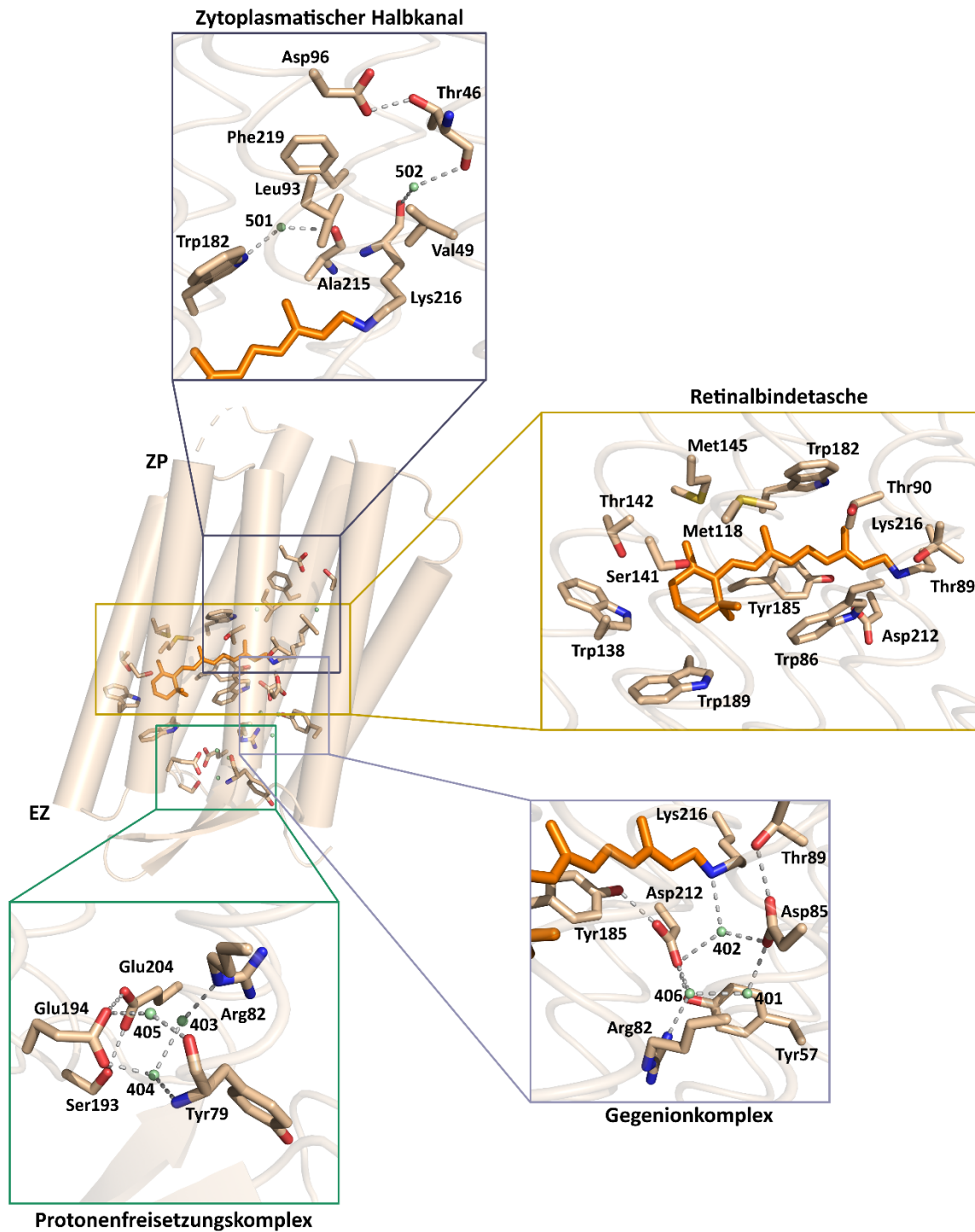
Kein membranständiges Protein wurde in struktureller Hinsicht so umfassend untersucht wie BR. Mittlerweile wurden bereits zahlreiche hochaufgelöste Strukturen des BR-WT, sowie zahlreicher Mutanten mittels Röntgen- ( $> 80$  Einträge in der „*Protein Data Bank*“, PDB) und Elektronenbeugung (6 PDB-Einträge), als auch Kernspinresonanz (3 PDB-Einträge) gelöst (Wickstrand *et al.*, 2015). Kürzlich konnten ergänzend auch zeitaufgelöste

Strukturänderungen von BR mithilfe eines *Freien-Elektronen-Lasers* aufgenommen werden (Nango *et al.*, 2016; Nogly *et al.*, 2018). In Abbildung 4 ist die auf 1.55 Å aufgelöste Kristallstruktur eines BR-Monomers in seinem Dunkelzustand [PDB: 1C3W] mit einer detaillierten Ansicht einiger funktioneller Bereiche dargestellt, anhand derer die Struktur in diesem Abschnitt eingeführt werden soll.

Die Transmembrandomäne von BR besteht aus sieben  $\alpha$ -Helices. Der Cofaktor Retinal formt hierbei eine RSBH<sup>+</sup> mit der  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe des Lys216 in Helix 7 und wird so kovalent gebunden. Die Delokalisation der  $\pi$ -Elektronen des konjugierten Systems, bestehend aus der C5=C6-Bindung des  $\beta$ -Ionon-Ringes und der Polyenkette des Chromophors, wird elektrostatisch und sterisch durch Seitenketten, die sich in räumlicher Nähe ( $\leq 3.6$  Å) befindlichen Reste Trp86, Thr89, Thr90, Met118, Trp138, Ser141, Thr142, Met145, Trp182, Tyr185, Trp189 und Asp212, moduliert (Abb. 4, gelb umrandet). Dieses Proteinsegment wird als Retinalbindetasche bezeichnet. Spezifische Mutationen vieler dieser Reste führten zu Verschiebungen des Absorptionsmaximums und/oder veränderten Isomerisierungskinetiken (Hartmut Luecke *et al.*, 1999; Brown, 2001). Einer der wenigen nicht konservierten Reste der Retinalbindetasche ist Met145. Die Substitution von Met145 zu einem Phenylalanin, wie es beispielsweise in Archaeorhodopsin-2 (Arch-2) und CsR nativ vorkommt, führt zu einer starken Anreicherung des all-*trans*-Isomers in der dunkeladaptierten Form und einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums um 10 nm (Ihara *et al.*, 1985).

BR wird in zwei funktionale Untereinheiten, den extrazellulären und zytoplasmatischen Halbkanal, unterteilt. Wie bereits in Abschnitt 1.3.1.1 beschrieben wurde, ist dabei die Orientierung der Schiff'schen Base zu dem jeweiligen Segment mitverantwortlich für die Unidirektionalität des Protonentransportes. Die extrazelluläre Hälfte beinhaltet sowohl den Gegenion- als auch den Protonenfreisetzungskomplex (Abb. 4, grün und grau umrandet) und verbindet über ein ausgedehntes H-Brückennetzwerk, das sechs Wassermoleküle beinhaltet, die RSB mit dem extrazellulären Raum.

Die in Abbildung 4 dargestellte Struktur des Gegenionkomplexes (grau umrandet), mit einer pentagonalen Konfiguration der beiden Gegenionen Asp85 und Asp212 sowie den Wassermolekülen, 401, 402 und 406 ist konserviert für Protonenpumpen vom BR-Typ (Ernst *et al.*, 2014). Die anionische Konfiguration der beiden Gegenionen wird durch H-Brücken mit den Hydroxylgruppen benachbarter Reste stabilisiert. Asp85 formt eine H-Brücke zur Hydroxylgruppe des Thr89 und Asp212 bildet je eine H-Brücke zu der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyr57 und des Tyr185 aus.



**Abbildung 4** Ansicht eines Monomers aus der BR-Kristallstruktur [PDB: 1C3W]. Vergrößerte Detailansicht einzelner struktureller Segmente inklusive relevanter Aminosäuren. Wassermoleküle (hellgrüne Kugeln) und H-Brückenbindungen mit Abständen  $\leq 3 \text{ \AA}$  (graue Striche) sind illustriert. Gezeigte Aminosäurereste innerhalb der Retinalbindetasche befinden sich im räumlichen Nähe ( $\leq 3.6 \text{ \AA}$ ) des Retinals.

Ein weiterer Rest des Gegenionkomplexes ist Arg82, welches den Gegenion- mit dem PRC verbindet. Arg82 reguliert sowohl die  $pK_s$ -Werte von Asp85 und vom PRC als auch die Licht- zu Dunkeladaptation des Proteins (Dunach *et al.*, 1990; Otto *et al.*, 1990; Govindjee *et al.*, 1996) und ist folglich für die Funktion des BR unerlässlich. Die mit der Protonfreisetzung

assoziierten strukturellen Änderungen des Arg82 wurden im vorhergehenden Abschnitt 1.3.1.1 bereits angesprochen. Die genaue Herkunft des freigesetzten Protons ist dabei immer noch nicht abschließend geklärt. FTIR-Differenzspektren legten nahe, dass das Proton über einen protonierten Wassercluster im PRC (Abb. 4, grün umrandet) zur EZ Oberfläche transportiert werden kann (Garczarek and Gerwert, 2006). Die Freisetzung des Protons wird mit dem Aufbrechen der H-Brücke zwischen Ser193 und Glu204 assoziiert (Abb. 4, grün umrandet; Wolf *et al.*, 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es zu Fernkopplungseffekten zwischen Glu204 und dem primären Protonakzeptor Asp85 kommt, die den  $pK_s$ -Wert des Asp85 modulieren und so zum unidirektionalen Transport beitragen (Richter, Brown, *et al.*, 1996). Glu194 formt H-Brückenbindungen zu den Wassermolekülen 404 und 405. Beide Wasser werden zusätzlich über Rückgratwechselwirkungen mit Tyr79 stabilisiert (Abb. 4, grün umrandet). Des Weiteren wird Glu194 für die schnelle Freisetzung des Protons benötigt, die mit dem Übergang vom L- zum M-Intermediat assoziiert wird (siehe Abs. 1.3.1.1). Die Substitution von Glu194 durch ein Cystein hatte eine verlangsamte Protonenfreisetzung und eine vom pH-Wert unabhängige Ausbildung des M-Intermediates zur Folge, was weitere Kopplungseffekte zwischen Glu194 und dem Gegenionkomplex impliziert (Balashov *et al.*, 1997).

Die zytoplasmatische Hälfte von BR (Abb. 4, blau umrandet) ist, im Vergleich zur extrazellulären Hälfte, weitestgehend hydrophob. Zwei geordnete Wassermoleküle wurden in diesem Proteinsegment aufgelöst. Wasser501 verbindet das Rückgratsauerstoff des Ala215 mit dem Indol Stickstoff des Trp182. Die Ebene von Trp182 flankiert dabei die Polyenkette des Retinals und ist somit maßgeblich an sterischen Wechselwirkungen mit dem Chromophor beteiligt. Mutationen von Trp182 zu Phenylalanin verursachten mit 70 nm eine der stärksten für BR beobachteten hypsochromen Verschiebungen des Absorptionsspektrums (Mogi, Marti and Khorana, 1989). Auf Basis von UV-Resonanz-Raman-Studien wurde postuliert, dass es nach Isomerisierung des Retinals zu sterischen Repulsionen von Trp182 mit der C13-Methylgruppe des Retinals kommt, was entscheidend für die fortlaufende Kinetik des Photozyklus ist (Hashimoto *et al.*, 1997). Das zweite Wasser befindet sich im zytoplasmatischen Halbkanal, aus dem die Reprotonierung der RSB erfolgt. Wasser502 wird dabei durch H-Brücken mit den Rückgratsauerstoffen des Thr46 und des Lys215 fixiert. Thr46 formt eine weitere H-Brücke zu Asp96. Die Bedeutung dieser Wechselwirkung für die Funktion des Asp96 als primären Protondonor wurde bereits in Abschnitt 1.3.1.1 näher erläutert. Durch starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Val49, Leu93 und Phe219 wird eine Kavität geschaffen, die die RSB vom Zytosol abschirmt. Die strukturelle Neuordnung dieser Reste ist demnach zwingend erforderlich, um einen transienten Hydratisierungskanal zu formen, der die Reprotonierung der RSB ermöglicht. Entsprechend sind diese Reste an der Kinetik dieses

Reprotonierungsschrittes beteiligt (Brown, 2001).

### **1.3.1.3     *Elektrophysiologische Untersuchungen an BR***

Im Vergleich zu den umfassenden spektroskopischen Studien wurde die elektrophysiologische Charakterisierung von BR, aufgrund der schlechten Expression in Wirtszellen, nur vereinzelt vorgenommen und bleibt weitestgehend elementar. Die ersten elektrischen Untersuchungen von BR wurden in Proteoliposomen und so genannten „bimolekularen Lipidmembranen“ (BLM, Englisch „*bimolecular lipid membranes*“) vorgenommen und erlaubten bereits die Bestimmung erster elektrischer Charakteristika. So wurde eine licht-induzierte elektromotorische Kraft von  $\geq 300$  mV für BR bestimmt, die wie bereits durch frühere indirekte Beobachtungen vermutet, durch Protonentranslokation zustande kommt (Drachev *et al.*, 1974; Dancsházy and Karvaly, 1976). Eine qualitative Verbesserung der Experimente in BLM wurde durch Blitzlicht- statt Dauerlichtanregung erreicht, wodurch es möglich war, verschiedene kinetische Komponenten des Pumpzyklus zu segregieren und so photochemische mit photoelektrischen Intermediate zu korrelieren (Drachev, Kaulen and Skulachev, 1978; Keszthelyi and Ormos, 1980; Ormos, Dancsházy and Keszthelyi, 1980). Diese experimentell bestimmten elektrischen Zeitkonstanten waren hierbei in Übereinstimmung mit den spektroskopischen Daten und deuteten mit einer schnellen primären Protonenfreisetzung auf der extrazellulären und einer sekundären späteren Protonenaufnahme auf der zytoplasmatischen Seite deutlich auf den biphasischen Charakter des Pumpstromes hin (Drachev, Kaulen and Skulachev, 1978; Keszthelyi and Ormos, 1980). Jedoch erlaubten diese Experimente an artifiziellen Membranen keine Rückschlüsse zum Einfluss der Spannung auf den Protonentransport, da die nicht-native Proteinumgebung keine Vorzugsorientierung der zu inkorporierenden BR-Moleküle innerhalb der Membran induzierte und somit eine heterogene und rein statistische Verteilung vorlag. Erst mit der funktionalen Expression von BR in Wirtszellen (*Xenopus laevis* Oozyten und einer immortalisierten Tumorzelllinie aus human-embryonalen Nierenzellen (HEK293)), konnten photoelektrische Prozesse unter definierten Spannungen untersucht werden (Nagel *et al.*, 1995; Geibel *et al.*, 2001, 2013). Dadurch konnte die spannungsunabhängige Unidirektionalität der Pumpe demonstriert werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der sich unter Dauerlicht ausbildende photostationäre Strom nach Beendigung der Belichtung biphasisch mit einer schnellen und einer langsamen Zeitkonstante auf null abfiel. Im Gegensatz zur schnellen Komponente war die langsame Komponente dabei stark spannungsabhängig und die Zerfallsgeschwindigkeit nahm von 20 ms bei + 60 mV Haltespannung auf 80 ms bei -160 mV Haltespannung zu (Geibel *et al.*,

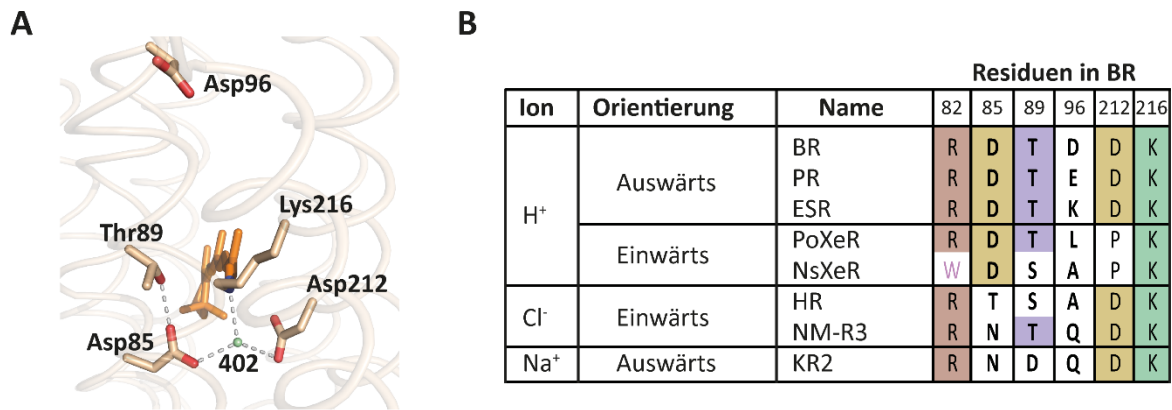
2001). Interessanterweise wurde eine Verlangsamung der Zerfallsgeschwindigkeit ebenfalls unter sauren Bedingungen festgestellt, was zu geringeren Photoströmen führte und so die Abhängigkeit des lichtinduzierten Pumpstromes vom pH-Wert des extrazellulären Mediums unterstrich.

### 1.3.2 Weitere Lichtgetriebene-Ionenpumpen

Lichtgetriebene Ionenpumpen können anhand ihrer Direktionalität und dem transportierten Ion klassifiziert werden. In Anbetracht der großen Zahl der aus Genomanalysen vorhergesagten potentiellen lichtgetriebenen Ionenpumpen, wird ersichtlich, dass die Zahl der näher charakterisierten Proteine nur einen geringen Bruchteil dessen darstellt (Kandori, 2015). Um die näher charakterisierten lichtgetriebenen Pumpen besser klassifizieren zu können, wurde auf Basis der BR-Architektur eine Gruppe hochkonservierter Reste definiert, die essentiell für den unidirektionalen Transport des Protons sind. Die Gruppe besteht aus dem primären Protonakzeptor Asp85 (D), Thr89 (T), sowie dem Protondonor Asp96 (D) (Abb. 5A, vgl. Abs. 1.3.1). Entsprechend bezeichnet man lichtgetriebene Ionenpumpen, die dieses konservierte DTD-Motiv aufweisen, als Pumpen vom BR-Typ. Heutzutage sind anderweitig konfigurierte Ionenpumpen bekannt, die deutliche Abweichungen von dem BR-typischen DTD-Motiv aufweisen (Abb. 5B) und im Folgenden näher vorgestellt werden.

Im Jahr 2000 wurde eine neue Klasse lichtgetriebener Protonenpumpen in marinen Proteobakterien entdeckt, die folglich als Proteorhodopsine (PR) bezeichnet wurden (Beja, 2000). Seit der Charakterisierung des namensgebenden, ersten Vertreters aus einem  $\gamma$ -Proteobakteriums konnten PR-typische Protonenpumpen auch in terrestrischen Bakterien und Eukaryoten identifiziert werden (Sharma *et al.*, 2008; Bamann *et al.*, 2014). Trotz einer hohen Sequenzhomologie zu BR weisen Protonenpumpen vom PR-Typ einige unterscheidbare, definierende Merkmale auf. Einen wesentlichen Unterschied stellt der Protonendonor der RSB dar. Während in Pumpen vom BR-Typ ein Asparaginsäurerest als Protondonor hochkonserviert ist, findet sich in PR an korrespondierender Stelle ein Glutaminsäurerest (Bamann *et al.*, 2014). Eine diesbezügliche Ausnahme stellen PRe aus *Exiguobacteria* dar. Die PRe aus *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) und *Exiguobacterium* sp. S17 (E17R) nutzen als Protondonor der RSB ein Lysin (Gushchin *et al.*, 2013; Albarracín *et al.*, 2016). Ein anderes Alleinstellungsmerkmal von Pumpen des PR-Typs ist eine veränderte Konfiguration des Gegenionkomplexes. Dieser beinhaltet eine konservierte Wechselwirkung des primären Protonenakzeptors (Aspartat) mit einem sich in räumlicher Nähe befindenden Histidin. Diese Histidin-Aspartat-Interaktion beeinflusst den  $pK_s$ -Wert des primären Protonakzeptors und

somit primäre Protonentransferdynamiken (Bamann *et al.*, 2014). Ein letzter signifikanter Unterschied zwischen lichtgetriebenen Protonpumpen vom PR- und BR-Typ ist die Abwesenheit des in BR konservierten PRC (vgl. Abs. 1.3.1). Die extrazelluläre Hälfte von PR zeigt diesbezüglich keinerlei Konservierung auf.



**Abbildung 5** **A** Ausschnitt des Gegenionkomplexes von BR [PDB: 1C3W] und dem Protonendonator Asp96. Beteiligte Reste in Stäbchenrepräsentation, Wasser als grüne Kugel und H-Brückenbindungen als graue Striche dargestellt. **B** Strukturbasierter Sequenzvergleich einer Auswahl lichtgetriebener Pumpen mit den jeweiligen konservierten Motiven. Referenzierte GenBank Einträge: BR: AAA72504.1, PR: AAG10475.1, ESR: WP\_026828439.1, PoXeR: WP\_051881467.1, NsXeR: EGQ43296.1, HR: BAA07823.1, NM-R3: BA055276.1, KR2: BAN14808.1

Lichtgetriebene Protonenpumpen sind die einzigen natürlich vorkommenden Pumpen, die je nach Typ, einen unidirektionalen Transport in Richtung der intra- (einwärtsgerichtet) oder extrazellulären Seite (auswärtsgerichtet) katalysieren (Abb. 5B). Einwärtsgerichtete Protonenpumpen gehören zur Klasse der Xenorhodopsine (XeR). Diese ungewöhnlichen mikrobiellen Rhodopsine aus Euryarchaeota wurden 2011 von Ugalde *et al.* vorgestellt und zeigen einen hohen Verwandtschaftsgrad zu ASR auf (Ugalde *et al.*, 2011). Die eigentliche funktionale Charakterisierung und der damit einhergehende Beweis für die Einwärtsdirektionalität des Pumpstromes wurden für das XeR aus dem Tiefseebakterium *Parvularcula oceani* (PoXeR) und dem Nanohaloarchaeon *Nanosalina* (NsXeR) erbracht (Inoue *et al.*, 2016; Shevchenko *et al.*, 2017). Ein interessanter Unterschied zwischen XeR und alle anderen lichtgetriebenen Ionenpumpen ist eine konservierte Substitution des in Helix 7 gelegenen zweiten Gegenions (Asp212 in BR) zu Prolin (Abb. 5B). Auch der Protonendonator der RSB ist in den beiden XeR durch aprotische, hydrophobe Reste ersetzt. Des Weiteren zeigte die Kristallstruktur des NsXeR ein Tryptophan (Trp72 in NsXeR) anstelle eines sonst konservierten Arginins (Arg82 in BR) auf. Dieses Arginin ist in anderen mikrobiellen Rhodopsinen von größter Bedeutung für die Funktionalität. Überraschenderweise zeigte sich, dass eine Substitution des Trp72 zu Arginin in NsXeR fatale Folgen für die Proteinfaltung hat und zum vollständigen Verlust der Funktionalität führt (Shevchenko *et al.*, 2017). Somit liegt



der Einwärtsdirektionalität des Pumpstroms keine bloße Reversion des auswärtsgerichteten Stromes, sondern ein gänzlich neuer Mechanismus der Protonentranslokation zu Grunde. Ein putativer Mechanismus ist in Shevchenko *et al.*, 2017 illustriert.

Chronologisch handelt es sich bei der zweiten, in der Literatur beschriebenen lichtgetriebenen Ionenpumpe um Halorhodopsin (HR, Abb. 5B). Diese auswärtsgerichtete Chloridpumpe wurde durch eine scheinbare lichtabhängige Protonenaufnahme BR-defizienter Stämme von *Halobacterium salinarum* entdeckt (Matsuno-Yagi and Mukohata, 1977; Sugiyama and Mukohata, 1984). HR besitzt kein BR-analoges DTD-Motiv, sondern ein für HR Isoformen einzigartiges TSA-Motiv (Abb. 5B). Folglich werden Chloridpumpen mit analoger Konservierung als HR-typisch bezeichnet. Ein neuer Typ von Chloridpumpen wurde erst 2014 in einem Meeresbakterium entdeckt (Yoshizawa *et al.*, 2014). Die Vertreter dieses Typs besitzen anders als HR ein konserviertes NTQ-Motiv (Yoshizawa *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016; Abb. 5B). Eine im Cyanobakterium *Mastigocladopsis repens* gefundene Chlorid-Pumpe (MrHR) hingegen besitzt ein TSD-Motiv und vereint somit Sequenzmotive beider lichtgetriebener archaealer Pumpen (Hasemi *et al.*, 2016). Was alle Typen dieser lichtgetriebenen Chloridpumpen offensichtlich eint, ist die Abwesenheit des in lichtgetriebenen Protonenpumpen hochkonservierten primären Protonenakzeptors (Asp85 in BR). Tatsächlich stellt die Abwesenheit die Grundlage für den Transportmechanismus dieser Pumpen dar. So konnte einerseits demonstriert werden, dass die RSBH<sup>+</sup> während des Photozykluses in HR nicht deprotoniert wird und somit die Dissoziation des RSB-Protons nicht essentiell für den vektoriellen Chloridtransport ist (Oesterhelt *et al.*, 1986; Varo *et al.*, 1995). Andererseits wandelte die Einführung des in HR nativen Threonins an analoger Position in BR (Asp85Thr), BR in eine schwache einwärtsgerichtete Chloridpumpe um (Sasaki *et al.*, 1995). Auch die umgekehrte Konversion einer Chlorid- zu einer Protonpumpe konnte für die Chloridpumpe MrHR durch Integration des für den Protonentransport in BR essentiellen Protonenakzeptors (Thr74Asp) gezeigt werden (Hasemi *et al.*, 2016).

Die neuesten Mitglieder der Familie lichtgetriebener Ionenpumpen sind lichtgetriebene Natriumpumpen. Die erste dieser Natriumpumpen wurde 2013 in dem Flavobakterium *Krokinobacter eikastus* (KR2) gefunden. Diese auswärtsgerichtete Pumpe besitzt ein für den Na<sup>+</sup>-Transport entscheidendes NDQ-Motiv (Inoue *et al.*, 2013; Abb. 4B). Heutzutage sind mehr als zehn andere für das NDQ-Motiv kodierende Rhodopsingene einer Vielzahl verschiedener Spezies bekannt (Kandori, 2015). Bereits zwei Jahre nach der Erstcharakterisierung von KR2, konnte die Kristallstruktur in zwei unabhängigen Arbeiten gelöst werden (Gushchin *et al.*, 2015; Kato, Inoue, *et al.*, 2015). Die Kristallstruktur zeigte auf, dass in KR2, analog zu der Wasserstoffbrücke zwischen Asp85 und Thr89 in BR, Asn112 eine Wasserstoffbrücke zu Asp116 ausbildet. Asp116 fungiert hierbei allerdings sowohl als

primärer Protonenakzeptor als auch als Protonendonator, der die RSB am Ende des Photozykluses reprotoniert. Diese Beobachtung erklärt auch, warum ein entsprechendes Äquivalent zu Asp96 in Natriumpumpen nicht gebraucht wird.

Die Übersicht in Abbildung 5B verdeutlicht, dass die natürliche Ionenselektivität lichtgetriebener Ionenpumpen auf die monovalenten Ionen  $H^+$ ,  $Cl^-$  und  $Na^+$  beschränkt ist. Es sollte allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass eine Mutante der lichtgetriebenen Natriumpumpe KR2 unter striktem Ausschluss größerer Kationen auch Cäsium-Ionen transportiert und ein kürzlich entdecktes Rhodopsin in *Synechocystis* sp. PCC 7509 neben  $Cl^-$  wohl auch das divalente Ion  $SO_4^{2-}$  pumpt (Konno *et al.*, 2016; Niho *et al.*, 2017).

### 1.3.3 Kanalrhodopsine

Die ersten ChRs wurden 2002 und 2003 in der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* identifiziert und der Chronologie nach ChR1 & ChR2 genannt. (Nagel *et al.*, 2002, 2003). In *C. reinhardtii* beeinflussen ChR1 und -2 über eine lichtinduzierte Depolarisierung der Zellmembran indirekt das Schlagmuster der Flagellen und somit das phototaktische Schwimmverhalten (Sineshchekov, Jung and Spudich, 2002; Berthold *et al.*, 2008). Die beiden Ionenkanäle leiten vorrangig Protonen, aber auch monovalente und bis zu einem gewissen Grad divalente Kationen mit unterschiedlichen Leitfähigkeiten ( $H^+ \gg Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+ \approx Ca^{2+} > Mg^{2+}$ ; Schneider, Grimm and Hegemann, 2015; Deisseroth and Hegemann, 2017). Obwohl mittlerweile eine Vielzahl nativer kationselektiver Kanalrhodopsine bekannt sind, ist ChR2 nach wie vor der am umfangreichsten charakterisierteste Vertreter dieser Proteinklasse (Schneider, Grimm and Hegemann, 2015; Deisseroth and Hegemann, 2017; Govorunova *et al.*, 2017).

Erst zwölf Jahre nach der Erstcharakterisierung von ChR1 wurden anionische Pendants (ACRs) aus der cryptophyten Mikroalge *Guillardia theta* (GtACR1 und -2) funktional beschrieben (Govorunova *et al.*, 2015). Auch diese anionselektiven Kanalrhodopsine zeigen ionspezifische Selektivität mit unterschiedlichen Leitfähigkeiten für eine Vielzahl verschiedener Anionen ( $NO_3^- > I^- > Br^- > Cl^- > F^- > SO_4^{2-}$ ; Govorunova *et al.*, 2015). Allerdings wurde mithilfe von Rauschanalysen eine unitäre Leitfähigkeit geschätzt, die die des ChR2 um das 10-fache übersteigt (Govorunova *et al.*, 2015). Nachfolgend konnten auch in anderen Cryptophyceae, wie der Alge *Proteomonas sulcata* (PsACR) anionselektive Kanalrhodopsine charakterisiert werden und fortlaufende Sequenzanalysen deuten auf 20 weitere ACRs in diversen marinen cryptophyten Algen hin (Wietek *et al.*, 2016; Govorunova *et al.*, 2017). In Analogie zu HR (Thr111) ist bei anionselektiven Kanälen an der analogen Position des

primären Protonakzeptors in BR (Asp85) keine saure Aminosäure konserviert. Stattdessen befindet sich an dieser Stelle in *GtACR1* und -2 ein Serin und in *PsACR* ein Alanin (Govorunova *et al.*, 2015; Wietek *et al.*, 2016).

Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung weiterer mikrobieller Rhodopsine aus Cryptophyceae konnte neben den anionselektiven Kanälen ein weiterer Typus von Kanalrhodopsinen beschrieben werden. Diese kationselektiven Kanäle (*GtCCR*) zeigen eine deutlich höhere Homologie zu der haloarcheellen Protonenpumpe BR als zu kationselektiven Kanalrhodopsinen aus Cryptophyceae (Govorunova, Sineshchekov and Spudich, 2016; Sineshchekov *et al.*, 2017; Yamauchi *et al.*, 2017). Während in ChR2 ein Glutamat (Glu123) als primärer Protonakzeptor fungiert und der Protondonor der RSB (Asp96 in BR) durch ein Histidin (His132) ersetzt ist (ETH-Motiv; Volkov *et al.*, 2017), besitzen kationselektive Kanalrhodopsine aus Cryptophyceae das BR-typische DTD-Motiv. Doch anders als in BR und in Analogie zu KR2, wird in *GtCCR2* die RSB durch den primären Protonakzeptor (Asp87 in *GtCCR2*; Asp85 in BR; Asp116 in KR2) reprotoniert, während die Deprotonierung des Asp98 (Asp96 in BR) für die Öffnung der Kanalpore mitverantwortlich ist (Sineshchekov *et al.*, 2017). An dieser Stelle soll auf zwei Unterschiede zwischen *GtCCRs* und allen anderen Kanälen sowie Pumpen hingewiesen werden. Das sonst konservierte Arginin (Arg82 in BR, mit Ausnahme NsXeR, siehe Abschnitt 1.3.2) ist in *GtCCR1* und -2 durch ein Prolin und in *GtCCR3* und -4 durch ein Lysin ersetzt, während sich an der Position des hochkonservierten Tryptophans (Trp86 in BR) ein Tyrosin befindet (Yamauchi *et al.*, 2017).

Das große Interesse an Kanalrhodopsinen beruht auf der Möglichkeit, Wirtszellen mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung zu de- bzw. hyperpolarisieren (Nagel *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Diese Technik findet große Anwendung in der Neurobiologie und wird in dem folgenden Abschnitt näher erläutert.

## 1.4 Optogenetik

Obwohl man unter Optogenetik grundsätzlich die lichtinduzierte Kontrolle jeglicher systemischer, zellulärer und enzymatischer Prozesse mithilfe heterolog exprimierter, lichtaktivierbarer Proteine versteht, finden optogenetische Experimente überwiegend in der Neurobiologie Anwendung (Deisseroth, 2011, 2015). In diesem Kontext versteht man unter Optogenetik die lichtinduzierte Modulation der neuronalen Membranpotentiale, die durch De- bzw. Hyperpolarisation zu einer Aktivierung oder Inhibierung von Neuronen führt. Schon in der ersten Publikation zu ChR1 (Nagel *et al.*, 2002) wurde auf die Möglichkeit verwiesen, dieses mikrobielle Rhodopsin als Werkzeug nutzen zu können, um lichtinduziert Membranpotentiale

zu modulieren. In den Folgejahren konnte gezeigt werden, dass durch die Expression von ChR2 in Neuronen, diese tatsächlich durch optische Stimuli mit einer sehr hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung aktiviert werden können (Boyden *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Ishizuka *et al.*, 2006). Da ChR2 zelltypspezifisch exprimiert werden kann, kam es zu einer Revolution innerhalb der Neurobiologie. Fortan waren Untersuchungen von neuronalen Netzwerken in Gewebe bis hin zu lebendigen Tieren möglich (Zhang *et al.*, 2006; Deisseroth, 2015). Zur optogenetischen Hyperpolarisation von Neuronen wurden jedoch vorrangig lichtgetriebene Chlorid- und Protonenpumpen benutzt (Zhang *et al.*, 2007; Chow *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011), da es erst 2014 gelang, ChR2 durch Mutagenese in einen anionenselektiven Kanal zu transformieren (Berndt *et al.*, 2014; Wietek *et al.*, 2014). Heutzutage können auch die natürlich vorkommenden anionleitenden Kanalrhodopsine zur Hyperpolarisation von Neuronen angewendet werden (Govorunova *et al.*, 2015).

Lichtgetriebene Protonenpumpen erlauben in diesem Kontext neben der globalen Hyperpolarisation eines Neurons auch spezifische Untersuchungen pH-abhängiger Prozesse innerhalb der Zelle. So gelangen beispielsweise die Azidifizierung synaptischer Vesikel und weitergehende Untersuchungen zur pH-abhängigen Signalübermittlung an synaptischen Membranen (Rost *et al.*, 2015; El-Gaby *et al.*, 2016; Mahn *et al.*, 2016). Des Weiteren werden Derivate der lichtgetriebenen Protonenpumpe aus *Halorubrum sodomense* (Arch-3), die eine spannungsabhängige Fluoreszenz aufweisen, als membranständige Spannungssensoren benutzt (Kralj *et al.*, 2011; Hochbaum *et al.*, 2014). Gerade im Hinblick auf die Expression für subzelluläre optogenetische Anwendungen können die im Vergleich zu ChR2 kleineren Protonenpumpen von Vorteil sein.

### 1.5 *Coccomyxa subellipsoidea* Rhodopsin

Die einzellige psychrotrophe Süßwasseralge *Coccomyxa subellipsoidea* (C-169) war der erste eukaryotische Mikroorganismus aus einer antarktischen Umgebung dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Blanc *et al.*, 2012). Dies erlaubte die Identifikation eines potentiellen Rhodopsins, das in der Plasmamembran der Alge lokalisiert ist (Ranjan and Kateriya, 2018) und eine hohe Homologie zu anderen BR-typischen lichtgetriebenen Protonenpumpen besitzt (Abb. 6). Die 2015 erfolgte elektrophysiologische Erstcharakterisierung dieses Rhodopsins bestätigte, dass es sich bei CsR um eine lichtgetriebene Protonenpumpe handelt (Vogt *et al.*, 2015). Da CsR große Photoströme in *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293-Zellen zeigt, war es möglich eine umfassende Untersuchung von Protonentransfermechanismen unter

kontrollierten elektrophysiologischen Bedingungen durchzuführen, die für BR so nicht möglich ist.

CsR	1	- - - - -	MAVHQIGEGGLVMY	WVTFG	- -	LMAFSALAF	AVMTFT	34
AR-2	1	- - - - -	MADVETETGMIAQ	WIVFA	- -	IAAAAAIAFG	VAVHF	33
BR	4	- - - - -	AQITGRPEWI	WLALGTAL	MGLGTL	YFLVKG	MG	33
Arch-3	1	- - -	MDPIALQAGYDL	LGDRPETL	WLGIGTL	LMLIGTFY	FLVRGWG	43
CsR	35	- RPLNKRSHGYIT	LAIVTIAAIA	YYAMAASGG	KALVSNPD	GNL	RDI	79
AR-2	34	- RPSELKSAYYIN	IAICTIAAT	YYAMAVNYQ	DLT - - -	MNGERQ	V	74
BR	34	VSDPDAKKFYA	ITTLVPAIA	FTMYLSML	LGGLTMV	- PFGGEQ	NP	78
Arch-3	44	VTDKDAREYYA	VTILVPGIA	SAAYLSM	MFFGIGL	TEV - TVG	GEMLDI	88
CsR	80	YYARYIDWFF	FTPLLLLD	IILLTGIP	IGVTLWIV	LADVAMIM	LGLF	125
AR-2	75	VYARYIDWVLT	TPLLLLD	LIVMTKMG	GMISWVIG	ADIFMIV	FGIL	120
BR	79	YWARADWLF	FTPLLLLD	LALLVDA	DQGTILAL	VGADGIM	GTGL	126
Arch-3	89	YYARYADWLF	FTPLLLLD	LALLAKV	DRVTIGTL	VGVDALM	VTGL	134
CsR	126	GALST - NSYRWG	YGVSCAFF	FVVLWGL	FFPGAKG	ARARGGQ	VPGL	170
AR-2	121	GAFEDEHKFKW	VYFIAGCVM	QAVLTYG	MYNATWK	DDLKKS	PEYHSS	166
BR	127	GALTKVYSYRF	VWVAISTA	AMLILYVL	FFGFTS	KAESMR	PEVAST	170
Arch-3	135	GALSHTAIARY	SWWLFST	ICMIVVLY	FLATSLR	SAAKER	ERGPEVAST	180
CsR	171	YFGLAGYLAL	LWFGYP	IVWGLA	- EGS	DYISVTA	EAA	215
AR-2	167	YVSLLVFLS	ILWVFYP	VVWAFG	- SSG	SVLSVD	NEAIL	211
BR	171	FKVLRNVT	VVLWSAYP	VVWLIG	SEGAG	IVPLN	IE	216
Arch-3	181	FNTLTALVL	VLTWTA	YPIILW	IIGTEG	AGVVLG	IE	226
CsR	216	VVFGWAVML	SHPLIARN	QTDGSL	LINSTND	PFVAST	THIPER	261
AR-2	212	PLFGMGCL	IAHETIF	KKMESKE	TLIEK	VVAT - - -	AQAIA - - - -	247
BR	217	VGFGILLR	SRAIFGEA	- EAP	EPSAGD	GAAA - - -	TSD - - - -	249
Arch-3	227	VGFGILLR	SRAILG	DT-EA	PEPSAG	ADVSA - - -	AD - - - -	258
CsR	262	FGGLMGKKRG	AGTPLAT	NEGVP	RKAAPT	AATTTAG	NPATAAEV	304
AR-2		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	
BR		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	
Arch-3		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	

**Abbildung 6** Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von CsR (XP\_005646688.1), *Acetabularia*-Rhodopsin 2 (AR-2; AEF12207.1), BR (AAA72504.1) und Arch-3 (BAA09452.1). Anordnung entspricht der Anzahl übereinstimmender Sequenzen, wobei die Blaufärbung die Identität in drei Abstufungen >40%, >60% und größer >80% kennzeichnet. Reste mit einer Identität <40% sind nicht eingefärbt. Einige funktionelle der für BR bereits diskutierten Reste sind durch eine gelbe Umrahmung hervorgehoben und explizit mit der äquivalenten Position in BR betitelt. Der nicht konservierte C-terminale Teil des CsR ist rot unterstrichen.

Im Rahmen seiner Dissertation konnte Dr. Arend Vogt (Humboldt-Universität zu Berlin) zeigen, dass der CsR-WT eine im Vergleich zu BR deutlich erhöhte Spannungsabhängigkeit und eine stark verringerte pH-Abhängigkeit zeigt (Vogt, 2017), was aufgrund der hohen Homologie beider Pumpen (~31.2% laut Percent Identity Matrix – Clustal 2.1; Larkin *et al.*, 2007) und der Konservierung essentieller Reste für den gerichteten Protonentransport (Abb. 6) so nicht zu erwarten war. Mutagenesestudien in der extrazellulären Hälfte von CsR, insbesondere Mutationen der beiden hochkonservierten Reste Tyr57 (substituiert mit Lysin) und Arg83 (substituiert mit Glutamin), führten weiterhin zu drastischen Veränderungen des H-Brückennetzwerkes und einer erhöhten Mobilität der

Wassermoleküle, die die Pumpe in einen protonselektiven Kanal umwandelten (Vogt *et al.*, 2015).

Interessanterweise ist die für CsR vorausgesagte C-terminale Sequenz (Aminosäuren 230-304) in lichtgetriebenen Protonenpumpen nicht konserviert. Auch eine erweiterte Suche mittels BLAST (Abkürzung für Englisch „*Basic Local Alignment Search Tool*“, Altschul *et al.* 1990) zeigte keine putativ konservierten Proteindomänen. Elektrophysiologische Messungen an einem verkürzten CsR Konstrukt, bei dem das nichtkonservierte C-terminale Segment abgeschnitten wurde, zeigten jedoch keine funktionalen Veränderungen gegenüber dem Volllängenkonstrukt (private Mitteilung Dr. Arend Vogt).

### 1.6 Zielstellung der Arbeit

Da CsR große Ströme in Oozyten und HEK293-Zellen zeigt, wurde es bereits für umfangreiche elektrophysiologische Studien verwendet, die Rückschlüsse auf die Beteiligung einzelner Reste zur Protonenpumpleistung erlaubten. Die meisten mechanistischen Schlussfolgerungen wurden hierbei allerdings aufgrund der hohen Homologie durch Vergleiche mit BR getroffen. Entsprechende Unterschiede zwischen BR und CsR, wie etwa die erhöhte Spannungs- und die geringere pH-Abhängigkeit, konnten so nicht erklärt werden.

Um CsR als Modellsystem für lichtgetriebene Protonenpumpen zu etablieren, bedarf es also weiterer photochemischer und struktureller Untersuchungen. Durch stationäre und zeitaufgelöste UV-vis-Spektroskopie sollte im Rahmen dieser Arbeit der Photozyklus des CsR-WT aber auch der durch Dr. Arend Vogt vorgestellten Kanalmutanten von CsR untersucht werden, um das mechanistische Verständnis von aktiven Pump- und passiven Kanalströmen zu erweitern. Weiterhin sollten mithilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse strukturelle Informationen zu CsR gesammelt werden, so dass funktionale mit strukturellen Unterschieden zu anderen lichtgetriebenen Protonenpumpen korreliert werden können. Dadurch könnte etwa das Verständnis der hohen Spannungs- und geringen pH-Abhängigkeit verbessert werden. Außerdem würde eine hochaufgelöste Struktur möglicherweise Rückschlüsse zu molekularen Determinanten des aktiven bzw. passiven Transportes erlauben.

Letztlich erschwert die hohe Spannungsabhängigkeit von CsR den Einsatz als optogenetisches Werkzeug, da bei hohen negativen Spannungen, wie sie beispielsweise in Neuronen (-70 mV) vorgefunden werden, die Pumpleistung stark reduziert ist. Mithilfe strukturbasierter Mutagenesestudien könnte diese Spannungsabhängigkeit reduziert werden und so CsR als neues optogenetisches Werkzeug etabliert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte/Vektoren/Enzyme

#### **Brutschränke & Inkubatoren**

HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific
innOva 44	New Brunswick Scientific
innOva 4200	New Brunswick Scientific
innOva 4230	New Brunswick Scientific
Multitron Pro	Infors HT

#### **Chromatographiesysteme**

Äkta Xpress	GE Health Care
Äkta Pure	GE Health Care

#### **Kristallisationsroboter**

Oryx 8	Douglas Instruments
Gryphon	Art Robbins Instruments

#### **Geldokumentation**

ChemiDoc MP	Bio-Rad Laboratories Inc.
-------------	---------------------------

#### **Laser**

Brilliant	Quantel
Brilliant B	Quantel

#### **Mikroskope**

Discovery. V20 /Sycop3	Zeiss
EVOS FL	Life Technologies
Stemi SV6	Zeiss

#### **Nutator**

Enviro-Genie SI-1202	Scientific Industries Inc.
----------------------	----------------------------

#### **PCR-Thermozykler**

Peqstar 96 Universal Gradient	Peqlab Biotechnologie
-------------------------------	-----------------------

#### **pH-Elektrode und -Meter**

SE100 N	Knick
pH-Meter 765 / 766 Calimatic	Knick

#### **Spektrophotometer**

Cary 300 Bio	Varian/Agilent Technologies
--------------	-----------------------------

#### **Sterilbänke**

SterilGARD 400E	The Baker Company
-----------------	-------------------

BioWizard Silver SL-130

Kojair

### **Zellzähler**

Luna Automated Cell Counter

Logos Biosystems

### **Zentrifugen**

Avanti J-20 XP

Beckman Coulter

Centrifuge 5415R

Eppendorf

MiniSpin Plus

Eppendorf

Megafuge 1.0R Heraeus

Thermo Fisher Scientific

Optima XE-90

Beckman Coulter

TLA-100

Beckman Coulter

### **Zentrifugen-Rotoren**

45Ti

Beckman Coulter

70Ti

Beckman Coulter

70.1Ti

Beckman Coulter

JA 25.50

Beckman Coulter

JLA-8.1000

Beckman Coulter

TLA-100.3

Beckman Coulter

### **Expressionsvektoren**

**Tabelle 1** Übersichtstabelle zu den verwendeten Expressionsvektoren

Zielorganismus	Vektor	Hersteller	Antibiotikaresistenz
P. pastoris	pPICZ	ThermoFisher Sc.	Zeocin™
HEK293T	pCDNA3.1(+)	Invitrogen	Ampicillin
DH10Bac/Sf21	pFastBac1	Invitrogen	Ampicillin

### **Restriktionsenzyme**

*Fast Digest* (FD)BamHI

Thermo Fisher Scientific

*Fast Digest* (FD)DpnI

Thermo Fisher Scientific

*Fast Digest* (FD)EcoRI

Thermo Fisher Scientific

*Fast Digest* (FD)NotI

Thermo Fisher Scientific

*Fast Digest* (FD)MssI

Thermo Fisher Scientific

*Fast Digest* (FD)HindIII

Thermo Fisher Scientific



**Weitere Enzyme****Tabelle 2** Übersichtstabelle weiterer verwendeter Enzyme

Enzym	Anwendung	Hersteller
<i>Fast</i> Alkalische Phosphatase (AP)	Dephosphorylierung	ThermoFisher Scientific
<i>Phusion</i> DNS-Polymerase	pCDNA3.1(+)	ThermoFisher Scientific
<i>DreamTaq</i> DNS-Polymerase	pFastBac1	ThermoFisher Scientific
T4 DNS-Ligase	Ligation	ThermoFisher Scientific
DNaseI	Hydrolyse zellulärer DNS	Roche

**2.2 Verwendete Geräte/Vektoren/Enzyme****E. coli Medien**

<u>LB-Medium</u>	1 %	w/v	Trypton
	0,5 %	w/v	Hefeextrakt
	1 %	w/v	NaCl

<u>LB-Agar</u>	LB-Medium
	1,5 % w/v Agar

<u>LB-Niedrigsalzmedium</u>	1 %	w/v	Trypton
	0,5 %	w/v	Hefeextrakt
	0,5 %	w/v	NaCl

<u>LB-Niedrigsalz-Agar</u>	LB-Niedrigsalzmedium
	1,5 % w/v Agar

**P. pastoris Medien**

<u>Hefeextrakt-Pepton-Dextrose-Medium (YPD)</u>	2 %	w/v	Trypton
	1 %	w/v	Hefeextrakt
	2 %	w/v	Glukose

<u>YPD-Agar</u>	YPD
	2 % w/v Agar

<u>YPD-Sorbitol (YPDS)</u>	YPD
	18,2% w/v Sorbitol

<u>Glycerin-Komplexmedium (BMGY)</u>	2 %	w/v	Trypton
	1 %	w/v	Hefeextrakt
	1 %	v/v	Glycerin
	1,34 %	w/v	YNB

<u>Methanol-Komplexmedium (BMMY)</u>	2 %	w/v	Trypton
	1 %	w/v	Yeast Extract
	100 mM		Kalium-Phosphat-Puffer
	1,34 %	w/v	YNB
	2,5 %	v/v	Methanol
	5 ml		BME/500 ml Medium
	5 µM		all-trans Retinal

### **HEK293T Medien**

<u>Kulturmedium</u>	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i> (DMEM, Biochrom) incl. 10% Fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom)
<u>Transfektionsmedium</u>	DMEM (Biochrom)

### **SF21 Medien**

<u>Kulturmedium</u>	Insect-XPRESS™ (Lonza) Sf900™ II SFM (ThermoFisher Scientific)
<u>Transfektionsmedium</u>	<i>Grace's Insect Medium</i> (GIM, ThermoFisher Scientific)

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PRC, Englisch „*polymerase chain reaction*“) stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, welches die Amplifikation sowie die Modifikation von DNS-Fragmenten erlaubt (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Entsprechend wurden mithilfe der PRC sowohl Restriktionsschnittstellen für den Einbau in verschiedene Vektoren ergänzt, Punktmutationen eingeführt und weitere Veränderungen des kodierenden DNS-Fragmentes vorgenommen. Das dazugehörige Temperaturprotokoll ist in Tabelle 4 angegeben. Die Temperatur der Primer-Hybridisierung wurde je nach Spezifität der Primer angepasst werden.

**Tabelle 3** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen
DNS-Templat	1 µl (50 ng)
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
Vorwärts Primer (10 µM)	1 µl
Rückwärts Primer (10 µM)	1 µl
5x Phusion HF-Puffer	10 µl
Phusion Polymerase (2U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	31 µl

**Tabelle 4** PCR-Temperaturprotokoll. Temperatur der Primer-Hybridisierung, sowie die Anzahl der Zykluswiederholungen konnte je nach Bedarf angepasst werden.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98	2	1x
Denaturierung	98	0,5	18-25x
Primer-Hybridisierung	55-60	0,75	
Elongation	72	1 /kpb	
Finale Elongation	72	5	1x

Die Resultate der PCR wurden auf Agarosegelen visualisiert.

### 2.3.2 Primerdesign

Primer für die PCR wurden *in silico* (Gentle Verison 1.9.4) konzipiert, sodass eine Schmelztemperatur von ~60°C erreicht wurde. Für die Einführung von Restriktionsschnittstellen wurden für das jeweilige Enzym am 5'- und 3'-Ende der Sequenzen nach Herstellerangaben Überhänge eingeführt, um einen vollständigen Verdau zu ermöglichen. Alle Primer wurden durch IDT (Integrated DNA Technologies) synthetisiert.

### 2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Visualisierung und Präparation von DNS-Fragmenten wurden Agarosegele aus TAE-Puffer und 1% w/v Agarose hergestellt und mit dem Cyanin-Farbstoff SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben angefärbt. Die DNS-Proben wurden mit 1x Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 90 - 120 V. Als Größenstandard wurde ein kommerzieller DNS-Marker (O'GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die DNS-Banden wurden durch Anregung mit Blaulicht sichtbar gemacht. Wenn nötig konnten die DNS-Fragmente mithilfe eines kommerziellen Kits (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel) zur späteren Verwendung direkt aus dem Gel isoliert werden.

### 2.3.4 Restriktionsverdau

Für den gerichteten Einbau von DNS-Fragmenten in Vektoren wurden das benötigte Fragment sowie der Vektor in separaten Reaktionsansätzen jeweils durch zwei unterschiedliche analoge Restriktionsenzyme geschnitten. Dafür wurde ein Reaktionsansatz nach Pipettierschema in Tabelle 5 angesetzt und für 45 – 60 min bei 37°C inkubiert. Beim Restriktionsverdau des

Vektors wurde dieser, um eine Religation zu verhindern, zusätzlich durch alkalische Phosphatase (FastAP, Thermo Fisher Scientific) dephosphoryliert. Das geschnittene Fragment wurde anschließend über ein kommerzielles Kit (NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit, Macherey-Nagel) isoliert. Der geschnittene Vektor wurde durch Agarosegelelektrophorese von dem inhärenten DNS-Fragment getrennt und wie oben beschrieben aus dem Gel isoliert.

**Tabelle 5** Pipettierschema zum Restriktionsverdau von DNS-Fragmenten und Vektoren. Mit \* markierte Komponente wurde nur beim Verdau von Vektoren hinzugegeben.

Komponente	Menge/ Volumen
DNS-Fragment	0,5 - 1 µg
1. Restriktionsenzym	1 µl
2. Restriktionsenzym	1 µl
10x FD-Puffer	2-5 µl
Fast-AP*	1µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 20-50 µl

### 2.3.5 Ligation

Zur Insertion des DNS-Fragmentes in den Vektor wurden Ligationsansätze mit einer Gesamtmenge von 500 ng DNS aus den zuvor geschnittenen Bestandteilen (Insert-DNS & Vektor) zusammengestellt und mit 1x T4 Ligase-Puffer (10x, Thermo Fisher Scientific) versetzt. Dabei wurde Vektor- und Insert-DNS in einem molaren Verhältnis von 1:4 (berechnet mithilfe von GENTle 1.9.1) eingesetzt. Nach Zugabe von T4 DNS-Ligase (1U/µl, ThermoFisher Scientific) wurde der Ansatz für 15 min bei 18°C inkubiert. Anschließend wurde ein Volumenanteil, der 125 ng ligierter DNS entsprach, in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Die relevante DNS-Sequenz wurde je nach Vektor aus der isolierten Plasmid-DNS mit den entsprechenden Sequenzierprimern durch LGC Genomics GmbH ermittelt.

### 2.3.6 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Einführung spezifischer Punktmutationen wurde ortsspezifische Mutagenese eingesetzt. Dafür wurde ein leicht verändertes PCR-Protokoll des „*QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*“ (Agilent Technologies) verwendet. Der PCR-Ansatz wurde entsprechend tät der Primer angepasst werden.

**Tabelle 3** angesetzt. Der verwendete PCR-Zyklus zur Amplifikation des neusynthetisierten Konstruktes ist in Tabelle 4 angegeben. Nach der Amplifikation wurde die parentale

methylierte DNS durch Zugabe von FD-DpnI (Thermo Fisher Scientific) verdaut (37°C, 30 min). Die Größe des nichtverdauten Fragments wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Konnte die Größe des Fragments auf dem Agarosegel verifiziert und keine weiteren Verunreinigungen detektiert werden, wurden 5 - 10 µl des verdauten Ansatzes zu chemokompetenten *E.coli*-Zellen gegeben und diese mittels Hitzeschock transformiert. Die relevante DNS-Sequenz wurde je nach Vektor aus der isolierten Plasmid-DNS mit den entsprechenden Sequenzierprimern durch LGC Genomics GmbH ermittelt.

### **2.3.7 Amplifikation und Isolation**

Nach Inkubation (16 h, 37°C) der transformierten *E.coli*-Zellen auf LB-Agar bzw. LB-Niedrigsalz-Agar mit entsprechendem Antibiotikum, wurde ein der benötigten DNS-Menge entsprechendes Volumen LB-Flüssigmedium bzw. LB-Niedrigsalz-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie der transformierten Zellen inokuliert und anschließend inkubiert (16 h, 37°C, 225 U/min). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4000 U/min, RT) vom Medium getrennt. Die Plasmid-DNS wurde je nach Menge durch die kommerziellen Kits *NucleoSpin®* oder *NucleoBond® Xtra Midi* (beide Macherey-Nagel) aus den Zellen extrahiert.

## **2.4 Allgemeine mikrobiologische Methoden**

### **2.4.1 Hitzeschock-Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen**

Gefrorene Aliquote chemokompetenter *E. coli*-Zellen (*XL1-blue* oder *Dh10b*) wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 - 100 ng Plasmid-DNS (im Fall von ortsspezifischer Mutagenese wurde die DNS-Menge nicht bestimmt) für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock (42°C, 45 s) unterzogen und erneut für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB- oder LB-Niedrigsalz-Flüssigmedium wurden die Zellen für 45 min bei 37°C und 225 U/min geschüttelt. 75 - 125 µl der Transformationsansätze wurden auf LB- oder LB-Niedrigsalz-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

## **2.5 Präparation von Bacmid-DNS**

### **2.5.1 Transformation von *DH10Bac™*-Zellen**

1 ng in 5 µl der sequenzierten Plasmid DNS des *pFastBac*<sup>™</sup>-Vektors mit transponiertem Konstrukt wurden mit 100 µl frisch aufgetauten kompetenten *DH10Bac*<sup>™</sup>-Zellen (Invitrogen) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock (42°C, 45 Sek) ausgesetzt und sofort danach erneut für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Flüssigmedium wurden die Zellen für 4 h bei 37°C und 225 U/min inkubiert. Nachfolgend wurden jeweils 100 µl der Transformationsansätze in drei Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml), Gentamicin (7 µg/ml), Tetracyclin (10 µg/ml), X-Gal (100 µg/ml) und IPTG (40 µg/ml) ausplattiert und für 48 h bei 37°C inkubiert. Bis zu 10 phänotypisch weiße Kolonien wurden auf frische LB-Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml), Gentamicin (7 µg/ml) Tetracyclin (10 µg/ml), X-Gal (100 µg/ml) und IPTG (40 µg/ml) übersetzt und erneut für 24 h bei 37°C inkubiert.

### 2.5.2 Analyse rekombinanter Bacmid-DNS

Kolonien, die nach erneuter Inkubation einen weißen Phänotyp bestätigten, wurden mit Hilfe von Kolonie-PCR weitergehend analysiert. Dafür wurde der in Tabelle 6 aufgelistete PCR-Ansatz mit jeweils einer Kolonie inokuliert.

**Tabelle 6** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für Kolonie-PCR

Komponente	Volumen (µl)
10x DreamTaq <sup>™</sup> Green Buffer	2
dNTP-Mix (2 mM)	5
M13-vorwärts Primer* (10 µM) 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'	1
M13-rückwärts Primer* (10 µM) 5'-GCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'	1
DreamTaq Polymerase (5 U/µL)	1
ddH <sub>2</sub> O	10

\* zur Verfügung gestellt von Dr. André Greiner

Zur Amplifizierung von Fragmenten aus rekombinanter Bacmid DNS wurde für den oben beschriebenen PCR-Ansatz der in Tabelle 7 zusammengefasste PCR-Zyklus durchgeführt. DNS-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Dabei konnten positive Klone (Bacmid mit transponiertem *pFastBac*<sup>™</sup>-Vektor) durch eine Fragmentgröße identifiziert werden, die sich aus ~2300 Bp und der Länge des Konstruktes zusammensetzt.

**Tabelle 7 PCR-Zyklus zur Amplifikation von Bacmid DNS mit Hilfe von Kolonie-PCR**

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95	3	1x
Denaturierung	95	0,5	25x
Primer-Hybridisierung	55	0,75	
Elongation	72	3	
Finale Elongation	72	5	1x

### 2.5.3 Isolation von rekombinanter Bacmid DNS

5 ml LB-Flüssigmedium mit Kanamycin (50 µg/ml), Gentamicin (7 µg/ml) und Tetracyclin (10 µg/ml) wurde mit positiven Klonen inokuliert und für 16 h bei 37°C und 225 U/min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (5 min, 4000 U/min, 4°C) pelletiert und das überschüssige Medium verworfen. Die Isolation rekombinanter Bacmid DNS aus den Zellen erfolgte dann unter Zuhilfenahme des *PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific). Eluierte Bacmid DNS wurde photometrisch quantifiziert und in für die spätere Transfektion benötigte Mengen (1-2 µg) aliquotiert. Kurzzeitige Lagerung (< 48 h) der Bacmid DNS erfolgte bei 4°C, Langzeitlagerung (>48 h) bei – 80°C.

## 2.6 Zellkultur und Proteinexpression in verschiedenen Zellsystemen

### 2.6.1 *Pichia pastoris*

#### 2.6.1.1 Linearisierung von Plasmid-DNS

Für die Transformation in *Pichia pastoris* wird linearisierte DNS benötigt. Dafür wurden 10 µg präparierter Plasmid-DNS in einem 50 µl Restriktionsverdauansatz (5 µl 10x FD-Puffer, 5 µl FD-MssI, aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O) für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 50 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2), 400 µl ddH<sub>2</sub>O und 500 µl Isopropanol gemischt und die DNS innerhalb von 20 min bei -80°C gefällt. Nachfolgend wurde die Lösung zentrifugiert (20 min, 16000 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das entstandene DNS-Pellet wurde mit vorgekühltem (4°C) 70%-igen Ethanol gespült und anschließend erneut zentrifugiert (15 min, 16000 g, 4°C). Der Überstand wurde erneut verworfen und das DNS-Pellet für 30 min bei RT getrocknet. Final wurde das Pellet in 11 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, wovon 1 µl zur Kontrolle durch Agarosegelelektrophorese benutzt wurden.

### **2.6.1.2 Vorbereitung kompetenter *P. pastoris*-Zellen**

Für jede Transformation wurden kryokonservierte *P. pastoris* SMD1168H Zellen neu in Kultur genommen. Dafür wurde eine Vorkultur aus 50 ml YPD-Flüssigmedium mit einem kleinen Teil (~ 20 µl) des gefrorenen Aliquots inokuliert und bei 30°C und 225 U/min für 24 - 48 h inkubiert. Der Transformation vorausgehend wurden 500 ml YPD-Medium mit einem bestimmten Volumen der Vorkultur inokuliert, so dass bei einer angenommenen Teilungsrate von 2 h die Zellen zum Zeitpunkt der Transformation eine OD<sub>600</sub> von 1,4 erreichten. Nach Erreichen der benötigten Zelldichte wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen pelletiert (5 min, 1500 U/min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die pelletierten Zellen wurden daraufhin in einem ersten Waschschrift in 500 ml vorgekühltem (4°C), bi-distilliertem Wasser resuspendiert und erneut pelletiert (5 min, 1500 U/min, 4°C). Der Waschschrift wurde nachfolgend mit 250 ml bi-distilliertem Wasser wiederholt. Abschließend wurden die Zellen in einer vorgekühlten (4°C) 1M Sorbitol-Lösung aufgenommen und nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1500 U/min, 4°C) in 1 ml der 1M Sorbitol-Lösung resuspendiert.

### **2.6.1.3 Transformation der kompetenten *P. pastoris*-Zellen**

10 µg linearisierter Plasmid-DNS wurden mit 80 µl der elektrokompetenten Zellen in einer sterilen, vorgekühlten Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite, Serva) gemischt und für 5 - 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch Elektroporation (1500 V, 200 Ω, 25 µF) transformiert und sofort in 1ml der vorgekühlten Sorbitol-Lösung aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 3 h bei 30°C inkubiert. Abschließend wurden jeweils 50, 100 und 200 µl der Zellsuspension auf YPDS-Agarplatten mit 100 µg /ml Zeocin™ ausplattiert und für weitere 72 h bei 30°C inkubiert.

### **2.6.1.4 Selektion stark-exprimierender Transformanten**

16 - 24 der größten aus der Transformation hervorgegangen Einzelkolonien wurden auf YPD-Agarplatten mit jeweils 500, 1000 und 2000 µg /ml Zeocin™ aufgeteilt. Dabei wurde versucht für alle Kolonien die gleiche Zellmenge in Form eines Kreuz-Austriches zu überführen, um das Wachstum der einzelnen Transformanten auf den Platten mit erhöhter Antibiotika-Konzentration besser unterscheiden zu können. Dem lag die Annahme zu Grunde, dass Transformanten mit multipler Integration des Fremdgens eine erhöhte Resistenz gegenüber Zeocin™ zeigen und so Rückschlüsse auf eine erhöhte heterologe Proteinexpression erlauben. 8-10 der Klone mit dem qualitativ stärksten Wachstum wurden für funktionale Expressionstests ausgewählt.



### **2.6.1.5 Funktionale Expressionstests**

Die auf funktionale Expression zu testende Klonen wurden jeweils in 10 ml BMGY-Flüssigmedium für 24 h bei 30°C und 225 U/min inkubiert. Anschließend wurde durch die Vermessung der OD<sub>600</sub> die Menge der benötigten Suspensionskultur ermittelt, die bei der Überführung in 10 ml BMMY-Flüssigmedium in einer OD<sub>600</sub> von 1 resultiert. Diese Fraktion wurde pelletiert (10 min, 4000 U/min, 4°C) und der Überstand verworfen, um überschüssiges Glycerol zu entfernen. Durch die Resuspension in BMMY-Flüssigmedium wurde die heterologe Proteinexpression initiiert. Die Ansätze wurden mit 5 µM all-*trans*-Retinal (Sigma-Aldrich) supplementiert und für 24 h bei 30°C und 225 U/min inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (10 min, 4000 U/min, 4°C) und die Rotfärbung der Pellets qualitativ verglichen. Die 3 Klone mit der stärksten Zellfärbung wurden kryokonserviert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.6.1.6 Expression & Ernte**

Zur Expression in größerem Maßstab, wurden 500 ml BMGY-Medium mit einem verifizierten Klon inokuliert und für mindestens 24 h bei 30°C und 225 U/min inkubiert. Wie bereits für die initialen Expressionstests beschrieben, wurden Fraktionen der Zellsuspension in 500 ml überführt, so dass die OD<sub>600</sub> des Expressionsmedium bei 1 lag. Das BMMY-Flüssigmedium wurde mit 5 µM all-*trans*-Retinal supplementiert und die Zellen für 24 h bei 30°C und 225 U/min inkubiert. Um eine ausreichende Belüftung der Zellen sicherzustellen, wurden als Expressionsgefäße 2l-Schikanekolben (Schott) verwendet. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4000 U/min, 4°C) geerntet und der Überstand verworfen. In einem nachfolgenden Waschschrift wurde das Pellet in ~100 – 200 ml Resuspensionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl) resuspendiert und erneut pelletiert (10 min, 4000 U/min, 4°C). Final wurde das Pellet in ~30 – 50 ml Resuspensionspuffer aufgenommen, in N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## **2.6.2 HEK293T**

### **2.6.2.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen**

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad (37°C) aufgetaut und sofort im Anschluss in 10 ml vorgewärmtes (37°C) Kulturmedium überführt. Zur Entfernung des in der Kryokonservierung eingesetzten DMSO, wurden die Zellen pelletiert (3 min, 500 U/min, RT) und der Überstand durch 10 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Nachfolgend wurden die

adhärenten HEK-Zellen in Kulturschalen ( $\varnothing$  10 cm, Corning, Sigma-Aldrich) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (HERAcell 240, Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Alle 72 h wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen und die Zellen vorsichtig mit 5 ml vorgewärmten DPBS-Puffer (Biochrom) gespült. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5 ml TrypLE (Gibco) von den Kulturgefäßen abgelöst, in 9,5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine frische Kulturschale abgelassen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zur Passage 25.

### **2.6.2.2     *Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit TurboFect & Ernte***

48 h vor der Transfektion, wurde das Kulturmedium von konfluenten Kulturschalen abgezogen und die Zellen nach vorhergehender Behandlung mit Trypsin (0,5 ml/Schale) in frischem, vorgewärmten Kulturmedium (9,5 ml / Schale) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde vollständig auf frische Kulturgefäße aufgeteilt (1:10, 1ml /Schale), mit 9 ml Kulturmedium pro Schale aufgefüllt und anschließend bis zur Transfektion bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dies resultierte zum Zeitpunkt der Transfektion in einer Konfluenz innerhalb der Kulturgefäße von etwa 70-80 %. Zur Transfektion wurde 1 ml/Schale auf RT vorgewärmtes DMEM mit 15 µg/Schale DNS und 30 µl/Schale TurboFect versetzt und nach kurzem Vortexen für ~15 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde das alte Medium der vorbereiteten Kulturgefäße gegen 9 ml frisches, mit 5 – 7,5 µM all-*trans*-Retinal (Sigma-Aldrich) supplementiertes Kulturmedium getauscht. Die Transfektionsmischung wurde anschließend zu gleichen Anteilen (1 ml / Schale) tröpfchenweise auf die Kulturgefäße verteilt und die Zellen für insgesamt 48 h inkubiert. Nach 24 h wurde die Farbe des Kulturmediums überprüft und bei starkem Gelbumschlag des pH-Indikators (Phenolrot) gegen frisches Kulturmedium getauscht.

Zur Ernte wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 3ml/Schale vorgekühltem Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS, Biochrom) incl. Proteasinhinhibitor-Mix, (*cOmplete*, Roche) gespült. Die Zellen wurden daraufhin mit einem Zellschaber (Biochrom) von den Kulturschalen gelöst und für einen weiteren Waschschrift vereint. Nach Zentrifugation (5 min, 2500 U/min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen erneut in DPBS mit Protease-Inhibitor resuspendiert (1 ml/Schale). Nach einem finalen Zentrifugationsschritt (5 min, 2500 U/min, 4°C) wurden die Zellpellets in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.6.3 Sf21

#### 2.6.3.1 Kultivierung von Sf21-Zellen

Alle Arbeiten zur Pflege und Erhaltung der Sf21 Stammkultur (Reaktivierung gefrorener Zellen, Kryokonservierung und Passagieren) wurden durch Christina Schnick und Melanie Meiworm (AG Experimentelle Biophysik, Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt. Parallel dazu wurde von Passage 3 bis Passage 25 eine Suspensionskultur durch den Experimentator geführt. Als Kulturmedien wurden Sf-900™ II SFM (Gibco, ThermoFisher) oder Insect X-Press (Lonzo) verwendet. Die Zellen wurden dabei, mit  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml für eine Passagendauer von 48 h und mit  $0,6 \cdot 10^6$  Zellen/ml für eine Passagendauer von 72 h angesetzt und bei 27°C und 100 U/min in einem für das Gesamtvolumen adäquaten Erlenmeyerkolben inkubiert. Passagiert wurden die Zellen durch einfaches Verdünnen in frischem Kulturmedium. Zur Bestimmung der Zellzahl, sowie der Zellvitalität wurde ein kleines Volumen der Zellsuspension ( $<50 \mu\text{l}$ ) in einem Verhältnis von 1:1 v/v mit Trypanblau (Gibco, ThermoFisher) gemischt und 10  $\mu\text{l}$  der Mixtur in die Zählkammer pipettiert, die anschließend automatisiert durch einen Zellzähler (Luna Automated Cell Counter, Logos Biosystems) ausgelesen wurde.

#### 2.6.3.2 Herstellung von rekombinanten Baculoviren

##### 2.6.3.2.1 Transfektion von Insektenzellen und Isolation von P1 Virusstock

Zur Transfektion wurden  $\sim 8 \cdot 10^6$  Zellen aus der fortlaufenden Suspensionskultur in einen Kolben mit einer finalen Konzentration von  $\sim 0,8 \cdot 10^6$  Zellen/ml überführt und für 24 h bei 27°C und 100 U/min inkubiert. Daraufhin wurde überprüft ob sich die Zellen in logarithmischer Wachstumsphase ( $1,5 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^6$  Zellen/ml) befanden und mit Hilfe einer 1:1 v/v Trypanblau-Färbung (Gibco, ThermoFisher) bestimmt, ob die Vitalität bei  $>95\%$  liegt. Waren beide Kriterien erfüllt, wurden  $0,8 \cdot 10^6$  Zellen in ein mit 2 ml *Grace* Insekten Medium (Gibco, ThermoFisher) befülltes Reaktionsgefäß einer 6-Well Platte (Cellstar®, Greiner Bio-One) gesät und für 15 Min bei RT stehen gelassen. Gleichzeitig wurden 8  $\mu\text{l}$  Cellfectin® II und 1- 2  $\mu\text{g}$  präparierter Bacmid DNS in jeweils 100  $\mu\text{l}$  *Grace* Insekten Medium verdünnt und anschließend unter behutsamen Mischen zusammengeführt. Die Mixtur wurde für 15-30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation wurde die Transfektionsmischung tröpfchenweise auf die ausgesäten Zellen gegeben und die gesamte Platte für 3-5 h bei 27°C inkubiert. Um Verdunstung des Transfektionsmediums zu vermeiden, wurde die Platte vorhergehend mit Parafilm (Bemis Company Inc.) abgedichtet. Anschließend wurde das Transfektionsmedium wahlweise gegen 2ml Sf-900™ II SFM Medium oder 2 ml Insect X-Press Medium getauscht und

die Zellen für 72 h bei 27°C inkubiert. Nachfolgend wurde der Überstand abgenommen (~ 2ml) und durch Zentrifugation (5 min, 500 U/min, RT) von Zellüberresten gereinigt. Der entnommene Überstand bildete den P1 Virus-Stock.

Alle darauffolgenden Arbeiten mit Sf21 Zellen erfolgten in Sf-900™ II SFM oder Insect X-Press Kulturmedium.

### 2.6.3.2.1.1 Amplifizierung des P1-Virusstocks – P2/P3

Zur Amplifikation des Virusstocks wurde ein entsprechendes Volumen von Suspensionskultur (~1.5·10<sup>6</sup> Zellen/ml) mit 5-10 % v/v P1-Virusstock inokuliert und bei 27°C und 100 U/min inkubiert. Alle 24 h wurde die Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung überprüft und protokolliert. Bei Unterschreitung eines Grenzwertes von 30% vitaler Zellen, wurde das Medium durch Zentrifugation (5 min, 500 U/min, RT) von zellulären Überständen getrennt und bildete so den P2-Virusstock. Teilweise kam es zu einer erneuten Potenzierung des Virusstocks. Diese lief dabei identisch zu der vorhergehend beschriebenen Amplifikation ab. Das Volumen des daraus resultierenden P3-Virusstocks lag in der Regel bei 50 – 100 ml. Die Virusstöcke wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

### 2.6.3.3 ***Expression & Ernte***

Zur Expression wurde ein Volumen von 400 – 500 ml Suspensionskultur mit einer finalen Konzentration von ~0,8·10<sup>6</sup> Zellen/ml angesetzt und für 24 h bei 27°C und 100 U/min inkubiert. Anschließend wurde überprüft, ob die Zellen sich in einer mittleren logarithmischen Wachstumsphase (1·10<sup>6</sup> – 2·10<sup>6</sup> Zellen/ml) befanden und die Vitalität der Zellen bei >95% lag. Waren beide Kriterien erfüllt, wurde die Expressionskultur mit 5-10 % v/v P2- oder P3-Virusstock inokuliert und für weitere 24 h bei 27°C und 100 U/min inkubiert. Konnten nach 24 h erste Zeichen einer Virusinfektion (vergrößerter Zelldurchmesser, verlangsamte Wachstumsraten) festgestellt werden, wurde die Expressionskultur mit 7,5 µM all-*trans*-Retinal (Sigma-Aldrich) supplementiert und für weitere 24 – 36 h bei 27°C und 100 U/min inkubiert. Die Zellen wurden bei einer Vitalität von ~80 % geerntet (10 min, 2500 U/min, 4°C), dabei konnte die funktionale Expression von CsR durch eine charakteristische Rotfärbung der Zellen nachgewiesen werden. Die Zellpellets wurden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## 2.7 Aufreinigung heterelog exprimierter Membranproteine

### 2.7.1 Besonderheiten in der Aufreinigung aus *P. pastoris*

Anders als Sf21 und HEK293T Zellen besitzt die methylotrophe Hefe *P. pastoris* eine Zellwand, wodurch die Aufreinigung membranständiger Proteine einen Zellaufschluss und die Isolierung der Membranfraktion voraussetzt. Zur Vorbereitung des Zellaufschlusses wurden die Proben in Resuspensionspuffer verdünnt (~ 10 g Zellen auf 100 ml Puffer) und unter Zugabe von DNaseI (Roche) in einem Glashomogenisator homogenisiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch drei konsekutive Durchläufe in einem Hochdruck-Homogenisator (EmulsiFlex-C3 oder EmulsiFlex-B15, Avestin) bei einem Druck von ~1500 bar und 4°C. Anschließend wurden vorhandene Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 16000 U/min, 4°C) pelletiert und verworfen. Aus dem Überstand wurde die Membranfraktion durch eine hochgeschwindigkeits-Zentrifugation (45 min, 40k U/min, 4°C) isoliert. Die sich im Überstand befindlichen löslichen Zellbestandteile wurden verworfen.

### 2.7.2 Solubilisierung der Membranproteine

Für *P. pastoris* wurde die pelletierte Membranfraktion in Resuspensionspuffer aufgenommen und in einem Glashomogenisator homogenisiert. Mit Hilfe einer BCA-Testreihe (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, ThermoFisher) wurde der ungefähre Proteingehalt ermittelt und für die spätere Solubilisierung auf 5 mg Protein/ml in Solubilisierungspuffer (Resuspensionspuffer incl. 1% v/v DDM) mit 25 mM Imidazol (pH 8) verdünnt. Im Fall von Sf21 und HEK293T wurden die Zellen unter Zugabe von DNaseI in 10 ml Solubilisierungspuffer mit 25 mM Imidazol (pH 8) pro ml Zellpellet verdünnt. Die Membranproteine in Solubilisierungspuffer für 8 h unter leichtem Rühren bei 4°C, solubilisiert. Nicht-solubilierte Fraktionen wurden durch hochgeschwindigkeits-Zentrifugation (45 min, 40k U/min, 4°C) segregiert.

### 2.7.3 Immobilisierte Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung des solubilierten Proteins erfolgte über immobilisierte Affinitätschromatographie der C-terminalen poly-Histidin-Sequenz (6x) mit Ni-NTA Agarose (Qiagen). Dieser Schritt erfolgte je nach erforderlicher Proteinmenge und Reinheit entweder manuell (für spektroskopische Experimente) oder automatisiert (für kristallographische Experimente).

### **2.7.3.1     *Immobilisierte Affinitätschromatographie – manuell***

Für kleinere Zellvolumina (Zellpellet < 5 ml) erfolgte die Affinitätschromatographie per Hand. 150 µl Säulenmaterial pro ml Zellpellet wurden dafür in konische Zentrifugationsröhrchen (15 oder 50 ml) überführt. Um überschüssiges Ethanol zu entfernen wurde das Säulenmaterial zentrifugiert (5 min, 4000 U/min, RT) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Material mit einem fünffachen Säulenvolumen bi-dist. Wasser verdünnt und zentrifugiert (5 min, 4000 U/min, RT). Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt und der Überstand jeweils verworfen. Final wurde die Säule mit drei Säulenvolumen Solubilisierungspuffer mit 25 mM Imidazol gemischt und erneut zentrifugiert (5 min, 4000 U/min, RT), wobei auch hier der Überstand verworfen wurde. Um das Protein an die Säulenmatrix zu binden wurde das Zelllysate zur equilibrierten Ni-NTA Agarose geben und für min. 12 h bei 4°C auf einem Nutator gemischt. Alle darauffolgenden Arbeiten erfolgten auf Eis beziehungsweise bei 4°C. Um nichtgebundene Fraktionen und überschüssiges Zelllysate zu entfernen, wurde die Mischung wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Agarose mit Waschpuffer gewaschen (wie oben für Waschung mit bi-dist. Wasser beschrieben). Zur Elution wurden zwei Säulenvolumen Elutionspuffer auf die Agarose gegeben und für 30 min bei 4°C auf dem Nutator inkubiert. Abschließend wurde das eluierte Protein durch Zentrifugation (5 min, 4000 U/min, 4°C) von der Agarose getrennt und in einem Dialyseschlauch gegen Dialysepuffer (50-faches Säulenvolumen) dialysiert. Der Dialyseschritt wurde einmal wiederholt. Abschließend wurde die Proteinmenge durch ein Absorptionsspektrum quantifiziert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem N<sub>2</sub> weggefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.7.3.2     *Immobilisierte Affinitätschromatographie – automatisiert***

Die immobilisierte Affinitätschromatographie erfolgte in größerem Maßstab an dem automatisierten FPLC (engl. „fast protein liquid chromatography“)-Chromatographiesystem Äkta Xpress (GE Health Science). Das Protein wurde an einer mit Bindungspuffer (Resuspensionspuffer incl. 25 mM Imidazol und 0,03 % w/v DDM) equilibrierten HisTrap FF Crude 5ml-Säule (GE, Health Science) gebunden. Die Elution erfolgte in 10 Säulenvolumen Elutionspuffer (Resuspensionspuffer incl. 500 mM Imidazol und 0,03 % w/v DDM). Dabei wurde das Eluat direkt in eine mit Solubilisierungspuffer equilibrierte HiPrep 26/10 Entsalzungssäule (GE, Health Science) überführt und nachfolgend fraktioniert (2 ml/Fraktion). Die Fraktionen wurden absorptionsspektroskopisch quantifiziert und alle relevanten Fraktionen vereinigt.

#### **2.7.4 Gel-Permeations-Chromatographie**

Die Gel-Permeations-Chromatographie erfolgte bei 4°C an dem automatisierten FPLC-Chromatographiesystem Äkta Pure (GE Health Science). Das Protein wurde hierfür in einem Amicon® Ultra (Merck) Zentrifugalfilter mit einer Porengröße von 50 kDa auf < 5ml aufkonzentriert und über eine 5 ml Injektionsschleife injiziert. Der Größenausschluss erfolgte an einer mit Dialysepuffer (Resuspensionspuffer incl. 0,03% DDM) equilibrierten HiLoad16/600 Superdex 200 pg (GE Health Science) Säule. Das Eluat wurde fraktioniert (1,4 ml/Fraktion) und die Absorption wurde während des Durchflusses bei 280 und 535 nm aufgezeichnet.

### **2.8 Allgemeine Methoden zur Proteinbiochemie**

Konnte keine Farbentwicklung der Zellpellets detektiert oder kein proteinspezifisches Absorptionsspektrum aufgenommen werden, wurden zum Nachweis der Expression die Bestandteile der eluierten Fraktionen dem Molekulargewicht nach über Gelektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die einzelnen Banden wurden über UV-Aktivierung der Gele sichtbar gemacht. Zur Detektion spezifischer CsR-Banden wurde ein Western-Blot durchgeführt.

#### **2.8.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in 12 %igen Polyacrylamid-Gelen (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™, Bio-Rad). Dazu wurden 15 – 30 µl Probevolumen mit 1x SDS-Ladepuffer (58.3 mM TRIS pH 6.8, 5%(v/v) Glycerol, 1.67%(w/v) SDS, 1.67%(v/v) β-Mercaptoethanol, 4.17%(w/v) Bromphenolblau) versetzt. Zur Einordnung der Bandengrößen wurden 6 µl eines Standards (SDS PageRuler, ThermoFisher Scientific) mitaufgetragen. Die Auftrennung erfolgte innerhalb von ~ 45 min bei 30 mA. Anschließend wurden die Banden durch UV-Aktivierung (1 min) in der Geldokumentation sichtbar gemacht.

#### **2.8.2 Western Blot**

Zur Detektion spezifischer Proteinbanden über eine kalorimetrische Farbentwicklung mittels alkalischer Phosphatase (AP) wurden die auf dem SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran aus Polyvinylidenfluorid (TransBlot® Turbo™ PVDF Membran, Bio Rad) übertragen. Dafür wurde die Membran zunächst mit Methanol aktiviert (15 s) und anschließend für 2 min in ddH<sub>2</sub>O und für 5 min in Übertragungspuffer (TransBlot® Turbo™

Transferpuffer, Bio Rad) inkubiert. Das Gel wurde auf der Membran platziert und zwischen zwei Lagen aus je einem dicken (*Gel-Blotting-Paper*, Whatman, GE Healthcare) und einem dünnen (Chromatographiepapier 3MM Chr, Whatman, GE Healthcare) Filterpapier gepackt. Der Transfer wurde mithilfe des Trans-Blot®Turbo™ Systems (Bio Rad) durchgeführt (1,3 A, 25 V, 7 min). Anschließend wurde die Membran in Blockpuffer aus PBS (136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) inkl. 0,1 % (v/v) Tween 20 (PBS-T) und 5 % (w/v) Milchpuffer für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Die darauffolgende Bindung des primären Antikörpers (anti-His aus Maus, Sigma Aldrich, 1:4000) an die immobilisierten Proteine erfolgte über Nacht in PBS-T mit 1 % (w/v) Milchpulver. Nichtgebundene Antikörper wurden in drei Waschschritten (10 min leichtes Schütteln in PBS-T) entfernt. Anschließend wurde die Membran unter Zugabe des sekundären Antikörpers (anti-Maus IgG AP-Konjugat, aus Ziege, polyklonal, Sigma Aldrich, 1:2500) für 1 h in PBS-T unter leichtem Schütteln inkubiert. Erneut wurde nichtgebundener Antikörper in drei Waschschritten (wie oben beschrieben) entfernt. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe von 1-Step™ NBT/BCIP (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerangaben. Bei ausreichender Farbentwicklung der Banden, wurde die Reaktion durch Spülen der Membran in ddH<sub>2</sub>O gestoppt. Die Membran wurde luftgetrocknet und archiviert.

## 2.9 Biophysikalische Methoden

### 2.9.1 Spektroskopie

Mit Ausnahme der pH-Titration wurde das Protein für spektroskopische Messungen bei pH 7,4, 8 und 9 in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,03 % DDM und für Messungen bei pH 5 in 20 mM MES, 150 mM NaCl, 0,03 % DDM verdünnt.

#### 2.9.1.1 Stationäre UV-Vis-Absorptionsspektroskopie

Die Aufnahme stationärer UV-Vis-Absorptionsspektren des Proteins erfolgte in einer Mikroküvette (16.160-F/Q/10-Z15, Starna) durch die implementierte Scan-Routine an einem Cary 300 Bio Spektrophotometer (Varian). Absorptionsspektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 700/650 – 270 nm mit einer spektralen Auflösung von 1 nm aufgezeichnet. Die Absorption jedes Wellenlängenpunktes wurde über 0,066 s gemittelt. Zur Basislinienkorrektur wurde vorhergehend ein Pufferspektrum aufgezeichnet das automatisiert von dem Proteinspektrum subtrahiert wurde.



#### 2.9.1.1.1 Messungen zur Lichtadaptation

Für die in Abb. 18B dargestellte Messung der Lichtadaptation, wurde frisch aufgetautes Protein (OD ~1) für 8 h lichtgeschützt bei RT dunkeladaptiert und nachfolgend ein Teil der Probe vermessen. Der andere Teil der Probe wurde vor der Aufnahme eines Spektrums für 30 Sek mit einer 530 nm LED (Luxeon LXHL-NM98 Star/O, Philips) und bildete so ein lichtadaptiertes Absorptionsspektrum ab.

#### 2.9.1.1.2 pH-Titration

Zur Messung der pH-abhängigen spektralen Verschiebung, wurde das Protein vor jeder Messung in einem Zentrifugalfilter mit einer Porengröße von 50 kDa auf ~20 µl konzentriert und in 400 µl Puffer mit dem entsprechenden pH verdünnt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, bevor die Probe vermessen wurde. Zur Titration des pH wurde der pH sukzessive erniedrigt. Die aufgenommenen Spektren wurden auf die Absorption bei 280 nm normiert um etwaige Verluste des Proteins zu kompensieren. Für den pH-Bereich von pH 2,2 – 3,6 wurden Puffer nach Rezeptur von aus einer 200 mM Glycin Stammlösung mit unterschiedlichen Volumina 1M HCl gemischt. Final wurde die Konzentration des Glycins durch Zugabe von Wasser auf 50 mM reduziert. Die Konzentration der HCl unterschied sich für die jeweilige pH-Bedingung. Im pH-Bereich von pH 4 – 7 wurden Puffer aus 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 100 mM Citrat-Stammlösung angesetzt. Die Rezepturen der Puffer wurden aus Ruzin, 1999, Plant Microtechnique and Microscopy entnommen. Alle Puffer enthielten 150 mM NaCl und 0,03% DDM. Durch die Korrelation der Wellenlängen der maximalen Chromophorabsorption gegen den pH konnte ein sigmoidaler-Kurvenverlauf durch eine Boltzmann-Funktion angenähert werden. Die Auswertung erfolgte mithilfe von Origin 9G.

#### 2.9.1.2 ***Zeitaufgelöste UV-vis-Absorptionsspektroskopie/ Blitzlicht-Fotolyse***

Zeitaufgelöste UV-vis-Messungen erfolgten an einem modifizierten LKS60 (Applied Photophysics Ltd.) Blitzlicht-Fotolyse-System, das durch den Einbau einer ICCD (engl. *intensified charge-coupled device*) -Kamera (iStar DH734, Andor Technology Ltd) und einem vorgeschalteten Spektrographen (Shamrock SR303-i, Andor Technology Ltd.) eine spektrale Auflösung von ~0,4 nm erlaubte. Das Protein mit einer OD von ~0,3 (Chromophorabsorption) befand sich in einer Drei-Fenster-Küvette (16.160-F/Q/10-Z15, Starna), sodass eine orthogonale Laserlicht (Brilliant und Brilliant B, Quantel)- induzierte Anregung und die Aufzeichnung eines Spektrums durch das Messlicht (XBO 150 W/CR OFR, Osram) möglich waren. Die Anregungswellenlänge wurde auf 530 nm eingestellt. Die Länge der Laserpulse

betrug  $\sim 10$  ns. Die Laserintensität wurde durch die Ausrichtung dichroitischer Spiegel im Strahlengang auf  $\sim 100$  mW (akkumuliert über 1 s) eingestellt (ermittelt mit Power Max PM 10V1, Coherent Inc.). Das Messlicht wurde durch eine mechanische Blende (Uniblitz LS6ZM2, Vincent Associates angesteuert durch VCM-D1, Vincent Associates) abgeschirmt. Zur Messung wurde die Messroutine „Hags. Andor-Driver\_040615“ (programmiert durch Dr. Rolf Hagedorn in der AG Exp. Biophysik) benutzt. Für jede Messung wurden die interne Kamerverstärkung und die Blendenöffnungszeit auf eine maximale Photonenabsorption von  $\sim 60000$  Photonen innerhalb des spektralen Fensters eingestellt. Die Messung erfolgte über 8 Dekaden (100 ns – 10 s) mit 41 Messpunkten (5 / Dekade). Zu jedem Messzeitpunkt wurde ein Spektrum ohne und mit vorheriger Laseranregung (Anregung erfolgte zum Zeitpunkt 0) aufgenommen. Zwischen den einzelnen Aufnahmen wurde die Probe für 15 Sek dunkeladaptiert. Der Messzyklus wurde in der Regel 15-mal wiederholt, wobei nach jedem 5 Durchlauf die Proteinprobe erneuert wurde, um mögliche Signalverluste durch Ausbleichen des Proteins zu verhindern.

### 2.9.1.2.1 Datenprozessierung

Die aufgenommenen Rohdaten wurden in einem ersten Schritt mit MATLAB R2013b (The MathWorks Inc.) prozessiert. Dafür wurden die Spektren der einzelnen Zeitpunkte über alle Zyklen gemittelt und die Extinktionsspektren aus der Differenz der Laser-angeregten und der Dunkelspektren berechnet ( $E = -\log_{10}(\text{Spektrum nach Anregung}(t)/\text{Dunkelspektrum}(t))$ ). Für diese Operationen wurde auf von Dr. Ralf Hagedorn (Humboldt-Universität zu Berlin) geschriebene Skripte zurückgegriffen. Die berechnete Extinktionsmatrix wurden nachfolgend mit Hilfe von Glotaran 1.5.1 (Snellenburg *et al.*, 2012) ausgewertet. Dafür wurden spektrale Inkremente über 6 Wellenlängen gemittelt, was in einer spektralen Auflösung von 2,1 nm resultierte und das Signal-Rausch-Verhältnis erheblich verbesserte. Anschließend wurden mit Hilfe des implementierten SVD (Singulärwert-Zerlegung, Englisch „*singular value decomposition*“)-Filters die signifikanten Komponenten der Datenmatrix bestimmt und der Datensatz mit den ermittelten Komponenten rekonstruiert (mit Ausnahme von CsR-Ala56His (2-Komponenten)), wurden immer 3 Komponenten berechnet). Der gefilterte Datensatz wurde in einer Globalen Analyse durch ein sequentielles Modell mit steigenden Lebenszeiten der einzelnen Komponenten modelliert. Dabei wurden die Datensätze in der Regel durch 5 Komponenten gefittet (Ausnahmen sind CsR-WT pH 5 und CsR-Arg77Gln, die jeweils durch 6 Komponenten gefittet wurden). Die aus der globalen Analyse hervorgegangenen EADS (Englisch „*evolution associated difference spectra*“) und die dazugehörigen Zeitkonstanten wurden für die Identifikation der Photozyklusintermediate genutzt. Zur Berechnung der Absolutspektren

einzelner Intermediaten, wurden die EADS mit dem zugehörigen Dunkelspektrum addiert. Dafür wurden die Wellenlängeninkremente der EADS mithilfe von Origin 9G auf 1 nm interpoliert. Es wurde von einer 10%igen Anregung der Photorezeptorproteine durch das Laserlicht ausgegangen. Weiterhin wurden alle dargestellten Konturplots, sowie Wellenlängentrajektorien aus Glotaran 1.5.1 extrahiert und mit Origin 9G weiterbearbeitet.

### **2.9.2 Schmelzpunktbestimmung mittels Tryptophanfluoreszenz**

Die Schmelzpunktbestimmung einzelner CsR-Proben erfolgte automatisiert (Prometheus NT.48, NanoTemper Technologies, Inc.). Hierfür wurden 10 µl Probe (OD ~ 1) in Glaskapillaren überführt und mit 1°C/min erhitzt. Nach vorhergehender Aufzeichnung eines Referenzwertes, wurde die Tryptophanfluoreszenz bei 330 und 350 nm aufgezeichnet und der Wendepunkt des Fluoreszenzsignals ausgelesen.

## **2.10 Kristallisation**

### **2.10.1 Kristallisation über Gasphasendiffusion**

Die Kristallisation über Gasphasendiffusion wurde in der Konfiguration eines sitzenden Tropfens (Englisch „*sitting-drop*“-Methode) durchgeführt. Dazu wurden 0,5 µl Tropfen der Proteinlösung in Konzentrationen von jeweils 5 und 10 mg/ml automatisiert (Oryx 8, Douglas Instruments) in Vertiefungen einer Mikrotiter Platte (MD11-00U, Molecular Dimensions) pipettiert und mit 0,5 µl Präzipitatlösung des entsprechenden Reservoirs (75 µl) bedeckt. Nach Auftrag aller Bedingungen wurde die Platte manuell mit Folie (Axygen™ Microplate Siegelfolie, Fisher Scientific) abgedichtet und lichtgeschützt bei 20°C inkubiert. Alle 7 Tage wurden die Platten unter Rotlicht auf Kristalle untersucht. Kristalle wurden zum Vermessen der Diffraktion aus der Vertiefung gepickt und nach Zugabe von 15-30% Glycerol oder Trehalose in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren.

### **2.10.2 Kristallisation in Lipid-Mesophasen**

Die Kristallisation in Lipid-Mesophasen (LCP, Englisch „*lipidic cubic phase*“) erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Szczepek von der AG Strukturanalyse, Charité. Zur Kristallisation wurde CsR in einer Konzentration von 35 mg/ml (Berechnung durch angenommenen Extinktionskoeffizienten von 45000) in einem Verhältnis von 1:1 mit Monoolein (X-LCP-101, Jena Bioscience) und 10% Cholesterol (C86667, Sigma) an einer LCP

Mix-Station (ART Robbins) in zwei LCP-Spritzen (ARI) für 1 h bei Raumtemperatur gemischt. Die Protein-Lipid-Mixtur wurde durch einen LCP-Pipettier-Roboter (Gryphon, ART Robbins) auf eine Glasplatte (96-Reaktionsbedingungen, 50 nl / Reaktionsbedingung) aufgetragen und mit 1  $\mu$ l / Reaktionsbedingung Präzipitatpuffer bedeckt. Anschließend wurde der Auftrag mit einer zweiten Glasplatte eingekeilt und so versiegelt. Die Platten wurden bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Alle 7 Tage wurden die Platten unter Rotlicht auf Kristalle untersucht. Kristalle wurden zum Vermessen der Diffraktion aus der Mesophase gepickt und in flüssigem N<sub>2</sub> ohne Zugabe eines Kryoschutzes schockgefroren.

### 2.10.3 Datenaufzeichnung und Strukturanalyse

Die Datenaufzeichnung und Strukturanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Strukturanalyse, Charité. Die Datenprozessierung wurde durch Andrea Schmidt und Dr. Patrick Scheerer vorgenommen. Diffraktionsdaten wurden bei 100 K an der Synchrotron Röntgenstrahl-Quelle an der Europäischen Synchrotron- und Strahlen-Einrichtung (ESRF, Englisch „*European Synchrotron and Radiation Facility*“) aufgezeichnet. Die besten Datensätze (höchste Auflösung) wurden am Strahlengang ID23-2 mit einem Pilatus 6 M Detektor bei  $\lambda = 0.8729$  Å erzielt. Alle Diffraktionsbilder wurden mit dem XDS Programmpaket (Kabsch, 2010) und den CCP4 Programmen SCALA (Evans, 2006) und AIMLESS (Evans and Murshudov, 2013) indexiert, integriert und skaliert. Die initialen Phasen des CsR wurden durch ein konventionelles molekulares Austauschprotokoll (engl. „*molecular replacement*“) mit AR-2 [PDB: 3AM6] als initiales Suchmodell erhalten. Nach Ausschluss des Retinals aus dem initialen Suchmodell wurde der molekulare Austausch mit dem Programm Phaser (McCoy *et al.*, 2007) durchgeführt. Weitere Simulationen zur Energieminimierung und der B-Faktor-Verfeinerung des initialen Modells wurden mit dem Programm PHENIX (Adams *et al.*, 2010) gerechnet. Alle kristallographischen Strukturen wurden mit anisotropischen Temperaturfaktoren für alle Atome mit TLS (Winn, Isupov and Murshudov, 2001) verfeinert. Mit dem CCP4 Programm REFMAC5 (Murshudov, Vagin and Dodson, 1997) wurden individuelle, zurückgehaltene B-Faktoren verfeinert und die Kristallstruktur finalisiert. Manuelle, strukturelle Anpassungen an die vorgegebene Elektronendichte wurden nach jedem Verfeinerungszyklus mit COOT (Emsley and Cowtan, 2004) vorgenommen. Strukturvalidierung erfolgte mit den Programmen PHENIX, SFCHECK (Vaguine, Richelle and Wodak, 1999), PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), WHAT\_CHECK (Hooft, Sander and Vriend, 1996) und RAMPAGE (Lovell *et al.*, 2003). Alle dargestellten Strukturen und Strukturelemente wurden mit PyMOL 2.0.1 (Schrödinger LLC.) visualisiert.

### 2.10.4 Weiterführende Analyse der Kristallstruktur

Zur weiterführenden Analyse der Kristallstruktur wurde verschiedene Software benutzt, die in Tabelle 8 zusammengefasst wurde.

**Tabelle 8** Software zur weiterführenden Analyse der Kristallstruktur

Aufgabe	Software	Spezifikation	Referenz/Urheber
Berechnung der Membranorientierung	PPM-Server	-	Lomize et al., 2012
Berechnung von Kavitäten	HOLLOW	0,2 Å Rasterabstand	Ho and Gruswitz, 2008
Darstellung der Kristallpackung	PyMOL 2.0.1	Skript: <i>supercell.py</i>	Thomas Holder, 2010
Berechnung des elektrostatischen Potentials	PyMOL 2.0.1	Plugin: APBS	Lerner & Carlson, 2006
Auflistung aller H-Brücken	PyMOL 2.0.1	Skript: <i>list_hb.py</i>	Dr. Robert L. Campbell, Queens University Kingston
C $\alpha$ -Angleichungen verschiedener Kristallstrukturen	PyMOL 2.0.1	Plugin: Alignment	Schrödinger LLC.

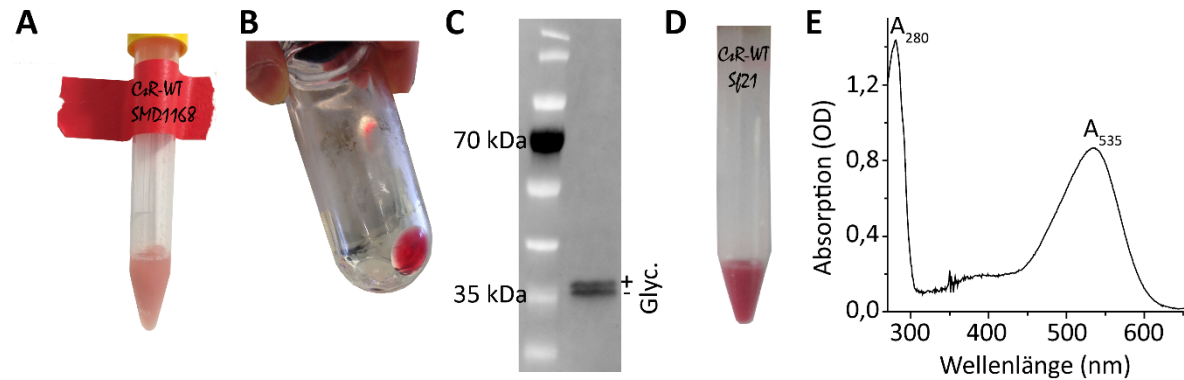
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression & Kristallisation

Für weiterführende spektroskopische und kristallographische Experimente an CsR musste das Protein heterolog exprimiert und aufgereinigt werden. Dabei wurden insbesondere für die Kristallographie verhältnismäßig große Mengen hochreinen Proteins benötigt. Die Expression und funktionale Aufreinigung rekombinanter Membranproteine ist jedoch nicht trivial. Den Arbeiten zu CsR ist ein Projekt an dem bistabilen Rhodopsin Parapinopsin (Koyanagi *et al.*, 2004) vorrangegangen. Dabei wurde versucht Parapinopsin in diversen Expressionssystemen heterolog zu exprimieren um es spektroskopisch näher charakterisieren zu können. Die Überexpression des Proteins in HEK293- und Insektenzellen wurde zwar biochemisch (Western-Blot, nicht gezeigt) nachgewiesen, zeigte jedoch einen starken Grad an Degradation auf. Die funktionale Aufreinigung erwies sich ebenfalls als außerordentlich kompliziert. Lediglich geringste Mengen ( $<1 \mu\text{g}/\varnothing 10 \text{ cm}$  HEK-Kulturgefäß) konnten über eine hochspezifische Affinitätschromatographie mit Antikörpern (1D4-Tag) aufgereinigt werden, was die Kosten der Proteinherstellung drastisch erhöht. Die Photoaktivierbarkeit des Proteins wurde weiterhin nur erhalten, wenn bei der Aufreinigung Lipide zugesetzt wurden. Nichtsdestotrotz war das rekombinante Protein nicht stabil und degradierte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von Stunden. Zusammengefasst konnte der Beweis der Machbarkeit hinsichtlich der Aufreinigung des Parapinopsins zwar erbracht werden und somit die publizierten Daten reproduziert werden, die Qualität und die Menge des rekombinanten Proteins waren allerdings für weitere biophysikalische Untersuchungen unbrauchbar.

Für CsR hingegen, war bereits vor Beginn dieser Arbeit bekannt, dass es sich gut in HEK293-Zellen exprimieren lässt (Vogt *et al.*, 2015). Bei HEK293-Zellen handelt es sich allerdings um eine adhärente Zellkulturlinie, was aufgrund der benötigten Wachstumsfläche das Arbeiten im Kontext kristallographischer Experimente impraktikabel macht. Um diese Limitierung zu umgehen, wurde CsR in verschiedenen Suspensionskulturen exprimiert. Bei Expression in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* (Stamm: SMD1168) zeigte sich bei Supplementation von *all-trans*-Retinal bereits eine markante Rosafärbung der pelletierten Zellen (Abb. 7A). Im Laufe der Aufreinigung wurde jedoch festgestellt, dass die Solubilisierung des Proteins (vgl. Abs. 2.7.2) nur unzureichend funktionierte (Abb. 7B), was zu einem erheblichen Verlust an funktionalem Protein führte. Dieses Problem konnte dadurch überwunden werden, dass die Primärstruktur des CsR um die 74 nicht konservierten C-terminalen Aminosäuren (vgl. Abb. 6) gekürzt wurde. Ein signifikanter Einfluss dieser

Modifikation auf die Funktionalität von CsR wurde wie bereits erwähnt durch elektrophysiologische Untersuchungen (Dr. Arend Vogt, Humboldt-Universität zu Berlin) ausgeschlossen. Ein weiteres Problem für die Kristallisation des Proteins stellte die bei der Expression in *P. pastoris* beobachtete heterogene Glykosylierung des Proteins dar, die im Western-Blot durch zwei separate Banden veranschaulicht werden kann (Abb. 7C).

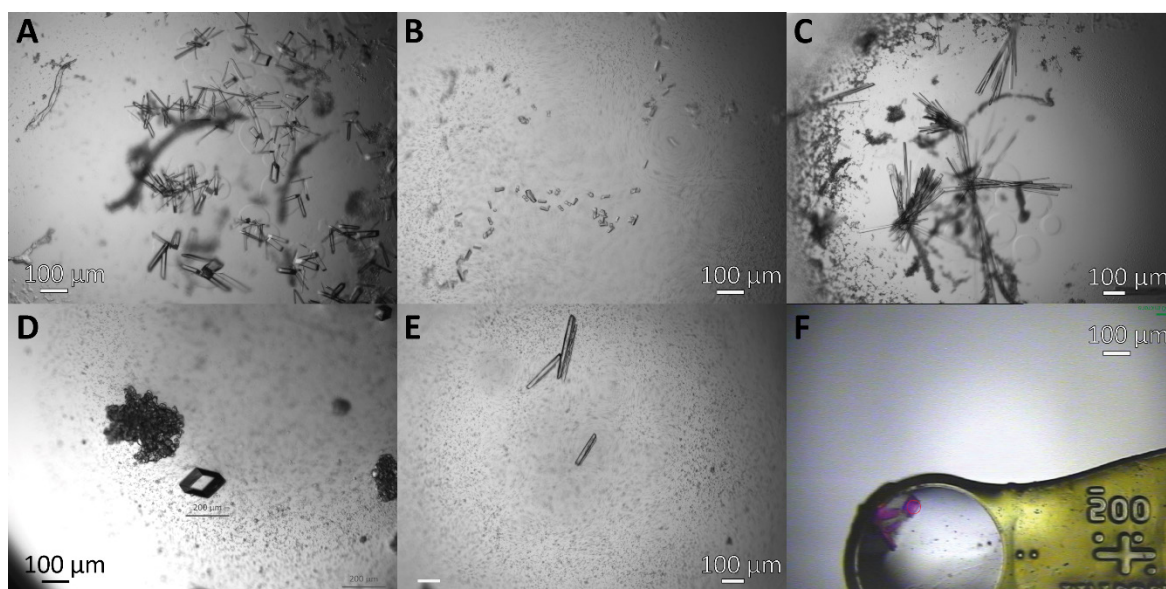


**Abbildung 7** **A** Pelletierte *P. pastoris* Zellen 24 Std. nach Induktion der Expression von CsR, supplementiert mit 5  $\mu$ M all-*trans*-Retinal. **B** Pelletierte nichtsolubilisierbare Membranfraktion der *P. pastoris* Zellen. **C** Western-Blot gegen den C-terminalen His-Tag des aus *P. pastoris* aufgereinigten CsR. Zwei separate Banden bei ~35 kDa erkennbar. **D** Pelletierte Sf21 Zellen 48 Std. nach Induktion der Expression von CsR, supplementiert mit 5  $\mu$ M all-*trans*-Retinal. **E** Absorptionsspektrum des aus Sf21 aufgereinigten CsR. Spezifische Chromophorabsorption bei 535 nm ( $A_{535}$ ). Absorption der aromatischen Reste bei 280 nm ( $A_{280}$ ).

Um die Homogenität des aufgereinigten Proteins zu verbessern, wurde die verkürzte CsR-Variante (folgend als CsR bezeichnet) in einem nächsten Schritt in Eiern der Mottenspezies *Spodoptera frugiperda* (Sf21, vgl. Abs. 2.6.3.3) exprimiert, die ein homogeneres Glykosylierungsmuster als *P. pastoris* aufweisen (Jenkins, Parekh and James, 1996). Sf21-Zellen zeigten nach Optimierung des Expressionsprotokolls eine starke Überexpression des CsR (Abb. 7D), die in etwa 0,5-1 mg rekombinantem Protein pro 100 ml Kulturmedium resultierten. Das Protein-zu-Chromophorverhältnis ( $A_{280}/A_{535}$ ) der besten Fraktionen des aus Sf21 aufgereinigten Proteins erreichte Werte von ~1,6 (Abb. 7E), was unter der Annahme eines molaren Extinktionskoeffizienten des Chromophores von  $\epsilon_{535} = 45000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , nahezu reines Protein darstellt (Extinktion der aromatischen Aminosäuren  $\epsilon_{280} = 66350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Dass ein so gutes Protein-zu-Chromophorverhältnis weder in HEK293T-Zellen noch in *P. pastoris* erreicht werden konnte, kann auf Verunreinigungen mit Cytochromen zurückgeführt werden, die durch die Absorption der Soretbande bei 408 nm identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Dass derartige Verunreinigungen bei Sf21-Zellen nicht festgestellt wurden, kann möglicherweise auf eine Veränderung der Zusammensetzung des Proteoms zurückgeführt werden, die durch die Infektion mit Baculoviren (vgl. Abs. 2.6.3.2.1) initiiert wurde. Quantitative Untersuchungen des Proteoms von Sf21-Zellen nach Infektion mit Baculoviren zeigten eine starke Verringerung Cytochrom-assoziiierter Proteine (Nayyar *et al.*, 2017),

wodurch es auch zu einer Degradation der Cytochrome selbst kommen kann. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass nichtsdestotrotz alle spektroskopischen Studien an aufgereinigtem Protein aus HEK293T-Zellen erfolgte, da dieses Expressionssystem eine transiente Expression heterologer Proteine ermöglicht, wodurch die Funktionalität (Inkorporation des Chromophores) etwaiger Mutanten schneller untersucht werden konnte.

Initiale Kristallisationsscreens des CsR wurden durch Dampfphasendiffusion in der Konfiguration des sitzenden Tropfens (Englisch „*sitting drop*“) durchgeführt (vgl. Abs. 2.10.1). Dabei zeigte CsR eine hohe Toleranz gegenüber einer Vielzahl von Pufferkonditionen und blieb teilweise über Wochen stabil (festgestellt durch Rotfärbung des Proteintropfens). Auch konnten bereits in diesen ersten Testreihen (960 initiale Kristallisationsbedingungen) CsR-Kristalle beobachtet werden. Beispiele einiger Kristalle sind in Abbildung 8 dargestellt.

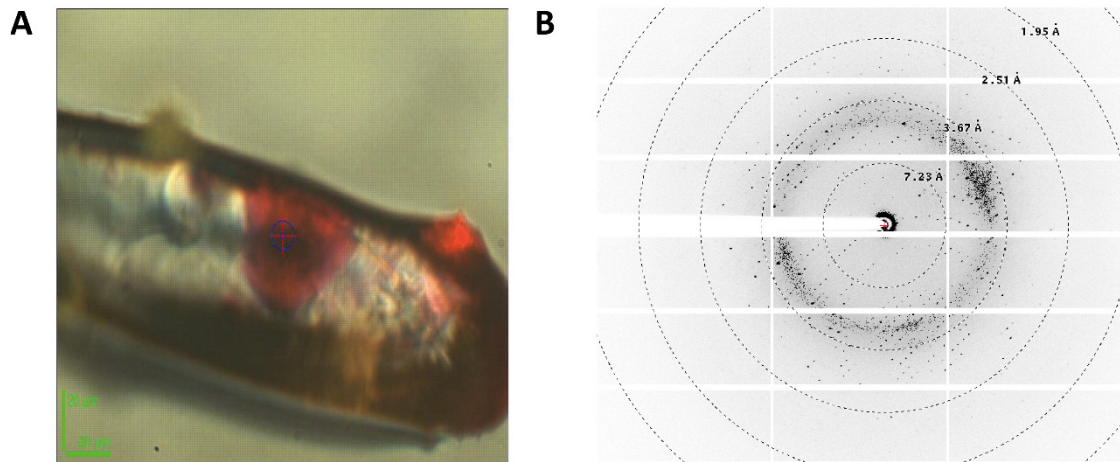


**Abbildung 8** Übersichtsdarstellung verschiedener Kristallformationen des CsR. Präzipitatpuffer: **A** 0,2M NaCl, 0,1M Bis-Tris, pH 5,5, 25% PEG3350 **B** 0,1M Tris, pH 8,5, 32% PEG500MME **C** 0,01M ZnCl<sub>2</sub>, 0,1M MES, pH 6, 20% PEG6000 **D** 0,02M Tris, pH 7,5, 22% PEG500MME **E** 0,1M NaCl, 0,1M MgCl<sub>2</sub>, 0,1M CAPSO, pH 9,5, 12% PEG4000 **F** CsR Kristalle aus 0,1M CaCl<sub>2</sub>, 0,1M Tris, pH 6,5, 13% PEG PEG2000MME.

Leider waren diese Kristalle nicht stabil oder zeigten eine nur schwach ausgeprägte Diffraktion ( $\geq 18 \text{ \AA}$ , Daten nicht gezeigt), sodass nicht einmal die Raumgruppe der Kristallpackung bestimmt werden konnte. Um die Qualität der Kristalle zu verbessern, wurde die Kristallisation in LCP (vgl. Abs. 2.10.2) fortgesetzt, die bereits zu vielen hochaufgelösten Kristallstrukturen verschiedener Rhodopsine und anderer Membranproteine beigetragen hat (Caffrey, Li and Dukkupati, 2012; Caffrey, 2015). In LCP-Testreihen (1920 initiale Kristallisationsbedingungen), die in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Szczepek in der AG Proteinstrukturanalyse/Kristallisation an der Charité durchgeführt wurden, konnten nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen bei 20 °C ebenfalls Kristalle beobachtet werden. Obwohl



die besten Kristalle nur einen Durchmesser von etwa 20  $\mu\text{m}$  besaßen (Abb. 9A), konnten sie erfolgreich an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble, Frankreich vermessen werden. Lediglich ein einziger Kristall (Präzipitatpuffer: 40 % PEG-400, 100 mM MES pH 6,5, 150 mM Natriumacetat, v/v), zeigte isotrope Diffraction mit Reflektionen bis zu 2  $\text{\AA}$  (Abb. 9B) und ermöglichte die Berechnung der Kristallstruktur von CsR, die in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden soll.



**Abbildung 9** **A** CsR-Kristall aus Bedingung mit 40 % PEG-400, 100 mM MES pH 6,5, 150 mM Natriumacetat. Aufgenommen in der Strahlführung ID23-2 des ESRF, Grenoble, Frankreich. **B** Diffractionsbild des Kristalls detektiert mit einem DECTRIS PILATUS3 X 2M Detektor bei  $\lambda = 0.8729 \text{ \AA}$ . Ringe dienen als Orientierung zur Charakterisierung der Streuqualität. Bilder zur Verfügung gestellt durch Dr. Michael Szczepek, AG Proteinstrukturanalyse/Kristallisation, Charité.

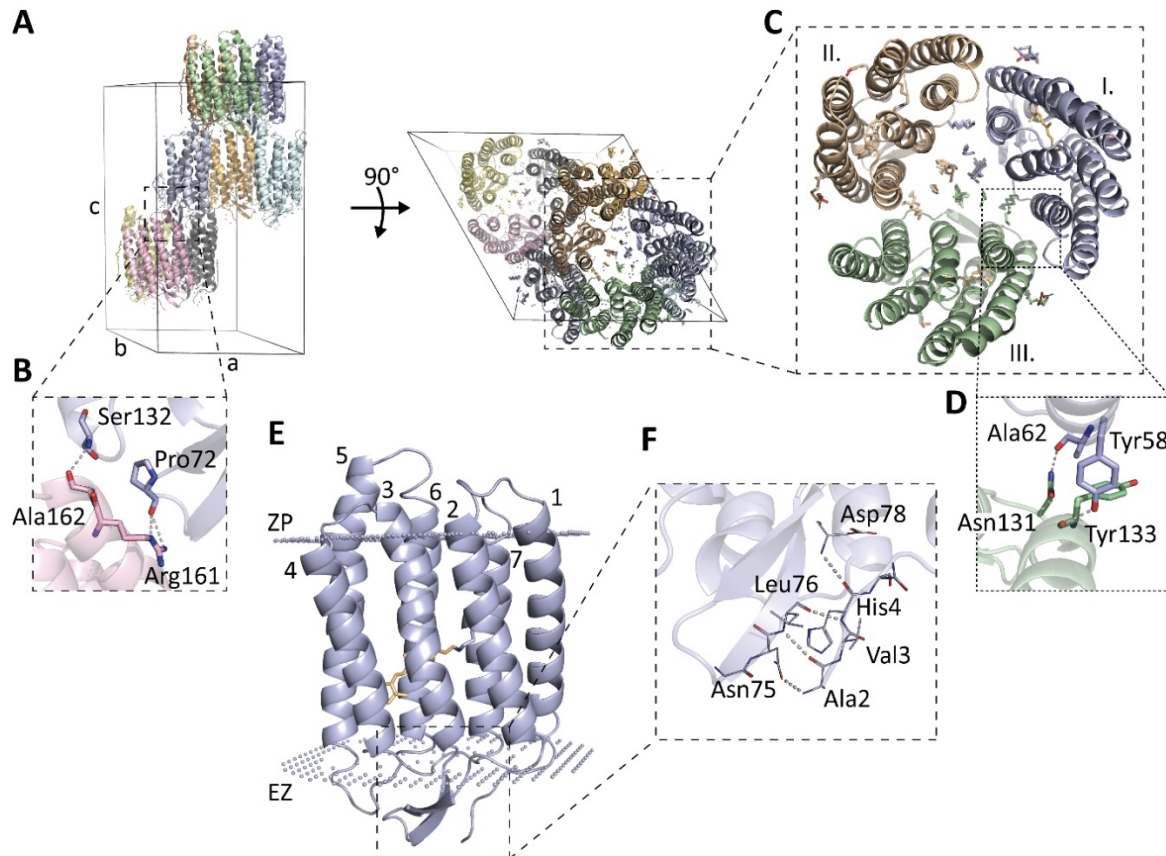
An dieser Stelle soll bemerkt werden, dass durch die Optimierung der oben genannten Kristallisationsbedingung keine Verbesserung der Auflösung erreicht werden konnte. Auch in weiteren Kristallisationsreihen (> 2400 Kristallisationsbedingungen) konnte kein Kristall hergestellt werden, der eine vergleichbare Diffraction aufwies. Selbst die Herstellung eines hochauflösenden Kristalls in der oben genannten Bedingung konnte bis zum heutigen Tage nicht reproduziert werden.

## 3.2 Kristallstruktur

### 3.2.1 Generelle Kristallarchitektur und Übersicht über die monomere Kristallstruktur

Die Kristallstruktur des CsR konnte bis auf 2  $\text{\AA}$  gelöst werden. Das Phasenproblem wurde dabei durch ein konventionelles molekulares Austauschprotokoll (Englisch „*molecular replacement*“) mit der AR-2 Struktur [PDB: 3AM6] gelöst (näheres siehe Abs. 2.10.3). Der Kristall besaß die hexagonale Raumgruppe H3 und die Einheitszelle hatte die Dimensionen

$a=b=78.078 \text{ \AA}$ ,  $c=143.951 \text{ \AA}$ ;  $\alpha=\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=120^\circ$ . Alle Parameter der Datenaufzeichnung und der Verfeinerungsstatistik sind in Tabelle A1 zusammengefasst. Die Einheitszelle enthielt 9 CsR-Monomere, wobei ein CsR-Monomer die asymmetrische Einheit ausmachte (Abb. 10A). Kristallkontakte wurden über Wechselwirkungen sowohl zwischen Arg161 und dem Rückgratsauerstoff des Pro72 als auch dem Rückgratsauerstoff des Ala162 zum Rückgratstickstoff des Ser132 vermittelt (Abb. 10B).



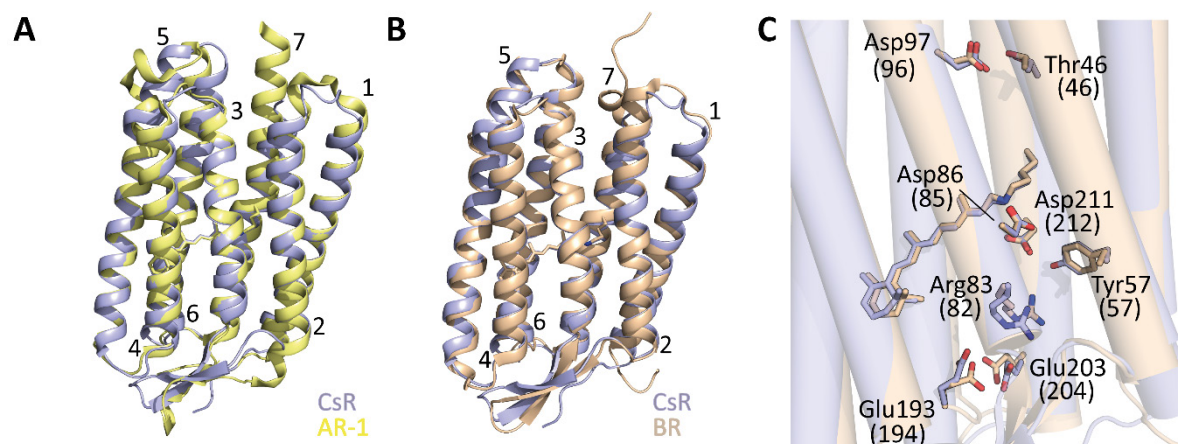
**Abbildung 10** **A** Einheitszelle des Proteinkristalls mit der Raumgruppe H3. Die Elementarzelle beinhaltet 9 Proteinmoleküle und hat die Dimensionen:  $a=b=78.078 \text{ \AA}$ ,  $c=143.951 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=120^\circ$ . **B** Vergrößerung der an den Kristallkontakten beteiligten Aminosäuren. **C** Vergrößerung der trimeren Unterheit. Monomere Proteinmoleküle sind farblich gekennzeichnet und römisch beschriftet. **D** Vergrößerung der an den interhelikalen Kontakten beteiligten Aminosäuren. **E** Monomere Ansicht des Proteins. Lage des Proteins in der Membran wurde mithilfe des PPM-Servers (Lomize *et al.*, 2012b) bestimmt. Grenzflächen zur zytoplasmatischen bzw. extrazellulären Oberfläche sind durch graue Kugeln dargestellt und mit ZP bzw. EZ beschriftet.  $\alpha$ -Helices mit 1-7 nummeriert. Retinal in orange dargestellt. **F** Detailansicht des über H-Brückenwechselwirkungen stabilisierten N-Terminus.

Die Monomere waren als trimere Subeinheit gepackt, die mit Ausnahme der Wechselwirkungen zwischen Ala62 zu Asn131 und Tyr58 zu Tyr133 (Abb. 10C, D), ausschließlich durch hydrophobe Wechselwirkungen der Lipide stabilisiert wurde. Eine solche trimere Subeinheit konnte bereits bei anderen lichtgetriebenen Protonenpumpen, wie z.B. BR, Deltarhodopsin-3 (DR-3) aus *Haloterrigena thermotolerans*, Cruxrhodopsin-3 (CR-3) aus *Haloarcula vallismortis* und Archærhodopsin-2 (Arch-2) aus *Halorubrum* sp. Aus-2,

beobachtet werden (Hartmut Luecke *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014; Kouyama *et al.*, 2014). Des Weiteren konnten in der asymmetrischen Einheit fünf Lipide aufgelöst werden, wobei zwei als 1-Monoolein (OLB) und eins als Cholesterol (CLR) eindeutig identifizierbar waren.

Das Monomer besteht, wie zu erwarten war, aus sieben transmembranen  $\alpha$ -Helices (Abb. 10E). Der Chromophor all-*trans*-Retinal ist kovalent über Lys215 in Helix 7 gebunden und trennt die zytoplasmatische von der extrazellulären Hälfte. An der extrazellulären Seite befindet sich zwischen Helix 2 und 3 ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblattmotiv das über sechs H-Brücken stabilisiert wird. Der sich ebenfalls an der extrazellulären Seite des Proteins befindende N-Terminus wird über vier weitere H-Brücken zu Resten innerhalb dieses Motivs stabilisiert (Abb. 10F).

Die in Abbildung 11 dargestellten  $C_{\alpha}$ -Angleichungen zwischen CsR und *Acetabularia*-Rhodopsin 1 (AR-1) aus *Acetabularia acetabulum* (Abb. 11A) bzw. BR (Abb. 11B) verdeutlichen die für lichtgetriebene Protonenpumpen konservierte Proteinfaltung.



**Abbildung 11**  $C_{\alpha}$ -Angleichungen von CsR (blau) mit **A** AR-2 [PDB: 5AWZ] (gelb) und **B** BR [PDB: 1C3W] (kupferfarben). Nummerierung der Helices an der letzten zugehörigen Helixwindung. **C** Überlagerung der für den Protonentransport essentiellen Reste zwischen CsR (blau) und BR (kupferfarben). Nummerierung in Klammern gibt die entsprechende Position in BR an.

Strukturelle Abweichungen zwischen den dargestellten Proteinen finden sich in den zytoplasmatischen Teilen von Helix 2 und 5, sowie der Loop-Anordnung zwischen Helix 2 und 3. Dabei ist Helix 5 in CsR um zwei Helixwindungen gegenüber AR-1 verlängert. Die sich in diesem Helixsegment befindlichen polaren Reste Lys158, Arg161 und Arg163 sind in Kontakt mit dem zytoplasmatischen Medium. Eine solche Anordnung positiver Reste erinnert an Sekundärstrukturen der spannungsregistrierenden Domänen spannungsabhängiger Ionenkanäle und Enzyme (Bezanilla, 2000; Murata *et al.*, 2005). Ein Einfluss dieses Segmentes auf die Spannungsabhängigkeit des lichtgetriebenen Protonentransportes wurde jedoch nicht weitergehend untersucht. Der Vergleich mit BR zeigt, dass Helix 2 in CsR verkürzt ist (Abb.

11B). Das hat zur Folge, dass das in BR mit einem potentiellen Protonenaufnahmekomplex assoziierte Asp38 (Lorenz-Fonfria *et al.*, 2017) fehlt. Eine detailliertere Besprechung eines möglichen Protonenaufnahmekomplexes für CsR erfolgt im weiteren Verlauf dieser Arbeit. Das an der extrazellulären Seite des CsR beobachtete  $\beta$ -Faltblattmotiv ist ein Strukturmotiv lichtgetriebener Pumpen aus Archaea und weder in Proteorhodopsinen noch in anderen Pumpen eukaryotischen Ursprungs präsent (Ran *et al.*, 2013).

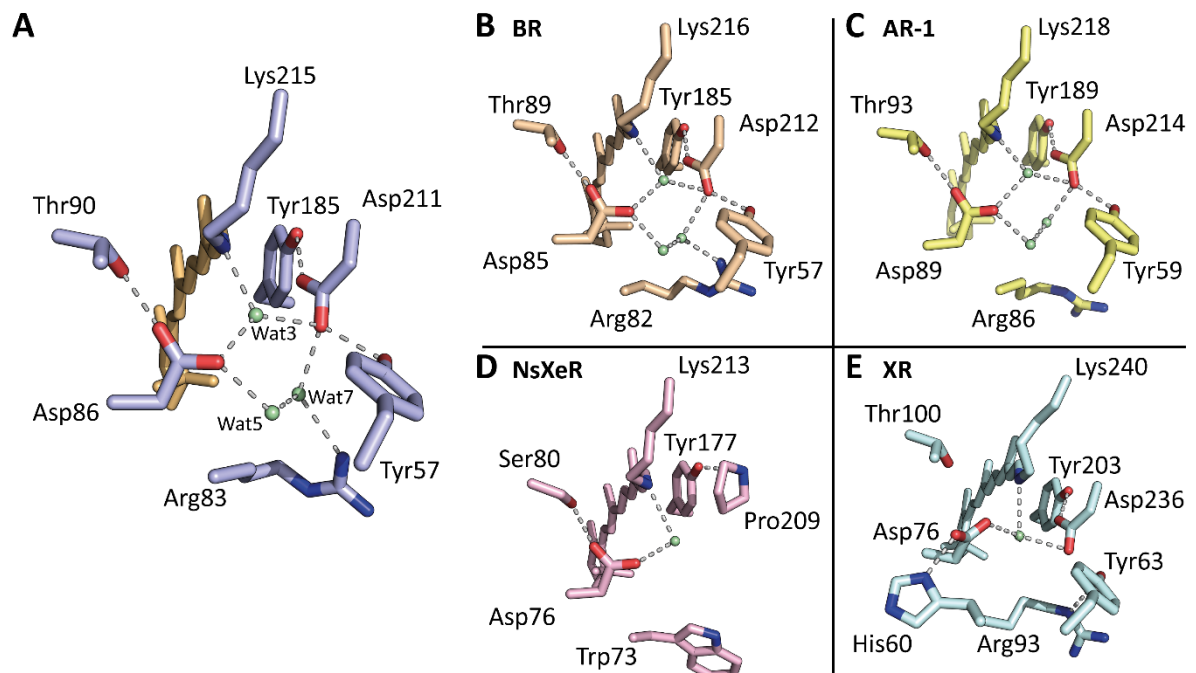
Des Weiteren war bereits aus Sequenzvergleichen von BR und CsR ersichtlich, dass die für die Protontranslokation essentiellen Reste in BR auch in CsR konserviert sind (vgl. Abb. 6). Entsprechend wurde für CsR ein zu BR homologer Protontransportmechanismus postuliert (Vogt *et al.*, 2015). Die in Abb. 11C dargestellte strukturelle Überlagerung dieser konservierten Reste unterstützt weitestgehend die Annahme eines homologen Mechanismus. Sowohl der primäre Protonakzeptor Asp86 (Asp85 in BR) und Protondonor der RSB Asp97 (Asp96 in BR), als auch die Reste Thr46, Tyr57 (beide äquivalent in BR) und Asp211 (Asp212 in BR) sind in beiden Pumpen identisch angeordnet. Die an der Protonenfreisetzung beteiligten Reste Arg83, Glu193 und Glu203 hingegen zeigen zwar eine gleiche Positionierung des  $C_{\alpha}$ -Atoms, unterscheiden sich aber in der Ausrichtung ihrer Seitenketten. Determinierende strukturelle Einschränkungen, die zu dieser Verschiebung führen, werden im Folgenden Abschnitt näher besprochen. Inwieweit sich mechanistische Unterschiede in der Protonenfreisetzung von diesen strukturellen Unterschieden ableiten lassen, wird im Zuge dieser Arbeit diskutiert.

#### 3.2.2 Extrazelluläre Hälfte

Die extrazelluläre Hälfte des CsR zeichnet sich durch ein hochkonfiguriertes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen aus, die die RSB mit dem extrazellulären Medium verbinden. Dieses Netzwerk umfasst sowohl den Gegenion- als auch den Protonenfreisetzungskomplex und disponiert damit die ersten elektrogenen Schritte des Photozyklus. Mutagenesestudien an einigen dieser Reste offenbarten entsprechend starke Einflüsse auf die Photochemie des Proteins, die im Laufe dieser Arbeit vorgestellt werden. Die extrazelluläre Hälfte des CsR zeigt interessanterweise sowohl typische Merkmale eukaryotischer als auch prokaryotischer Pumpen auf. In den folgenden Abschnitten werden Gegenion- und Protonenfreisetzungskomplex gesondert voneinander vorgestellt und Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede zu anderen lichtgetriebenen Pumpen besprochen.

### 3.2.2.1 Gegenionkomplex

Der Gegenionkomplex (Abbildung 12A) von CsR zeigt mit einer pentagonalen Anordnung der beiden Gegenionen und drei Wassermolekülen (Wasser 3, 5 und 7) eine Konfiguration, die für Pumpen vom BR-Typ konserviert und mitentscheidend für die Funktion als lichtgetriebene Protonenpumpe ist (Abb. 12A, B, C; Hildebrandt and Stockburger, 1984; Hartmut Luecke *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2014; Kouyama *et al.*, 2014; Furuse *et al.*, 2015). Die beiden Gegenionen werden über H-Brückenbindungen zu benachbarten Resten stabilisiert. Asp86 interagiert mit Thr90 im Abstand 2,7 Å und Asp211 wechselwirkt sowohl mit der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyr57 im Abstand von 2,6 Å, als auch mit der Hydroxylgruppe des Tyr185 im Abstand von 2,7 Å. Arg83 stabilisiert die pentagonale Konfiguration über eine H-Brücke zu Wasser7 im Abstand von 3 Å. In BR ist der korrespondierende Abstand zwischen Arg82 und Wasser 406 (Abb. 12B) geringer (2,7 Å). Diese strukturelle Verschiebung des Arg83 in CsR gegenüber Arg82 in BR kommt durch Wechselwirkungen zwischen Arg83 und Tyr14, sowie Glu203 zu Stande, welche in BR nicht konserviert sind und auf die im folgenden Abschnitt 3.2.2.2 näher eingegangen wird.



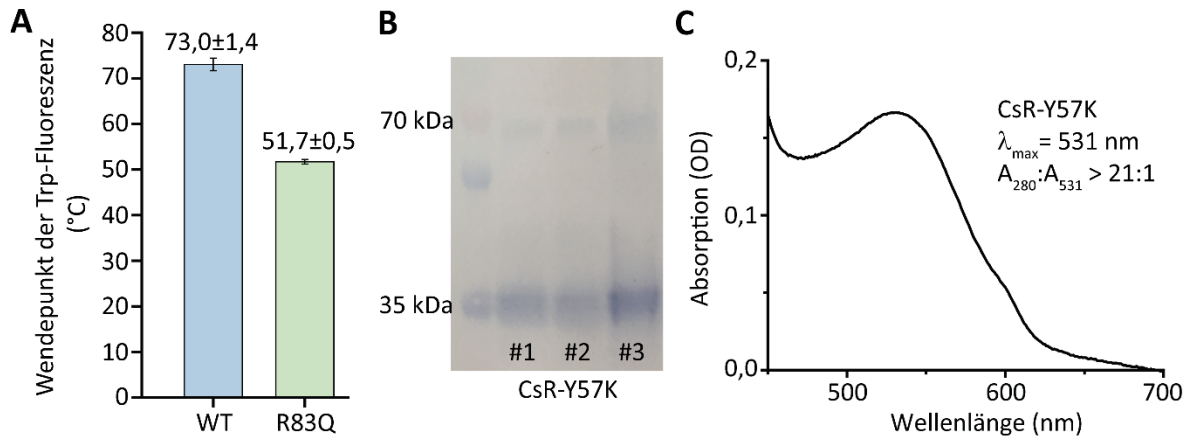
**Abbildung 12** A Detaillierte Darstellung des Gegenionkomplexes in CsR. Wasser durch grüne Kugeln dargestellt. Mögliche H-Brücken durch graue Striche skizziert. Vergleich der Gegenionkomplexe von anderen mikrobiellen Pumpen: BR [PDB: 1C3W] (B), AR-1 [PDB: 5AX0] (C), NsXeR [PDB: 6EYU] (D) und XR [PDB: 3DDL] (E).

In AR-1 ist das Arg86 gänzlich in Richtung des extrazellulären Raumes orientiert (Abb. 12C) und bildet keine H-Brücke zum korrespondierenden Wasser (Wasser 406) aus. Der



Einfluss der Orientierung dieses Arginins auf die Elektrostatik des Gegenionkomplexes wurde durch quantenmechanische Rechnungen an SRII untersucht. Dabei wurde die verschiedenartige Orientierung des Arg83 äquivalenten SRII-Arg72 als Hauptgrund für die gegenüber BR beobachtete starke Blauverschiebung des SRII ( $\lambda_{\text{max}} \sim 500 \text{ nm}$ ) ausgemacht (Ren *et al.*, 2001). In wie weit diese Schlussfolgerung allerdings auf andere mikrobielle Rhodopsine übertragbar ist, ist im Hinblick auf die vergleichbare Dunkelzustandsabsorption von CsR und AR-1 fragwürdig. Anderweitige Modulationen der Dunkelzustandsabsorption werden in Abschnitt 3.2.3 besprochen.

Wie in Abschnitt 1.5 bereits erwähnt, zeigten elektrophysiologische Untersuchungen an CsR-Arg83Gln, dass Arg83 für den Erhalt der Unidirektionalität der Pumpe unerlässlich ist. Der Austausch der positiv geladenen  $\delta$ -Guanidin-Gruppe gegen die neutrale  $\gamma$ -Mono-Amid-Seitenkette des Glutamins resultierte in rekombinantem Protein in einer verringerten Bindung des Cofaktors Retinal, was bereits in einer abgeschwächten Färbung der Zellpellets zu sehen war (nicht gezeigt). Ebenfalls kam es durch die Substitution zu einer Destabilisierung des aufgereinigten Proteins, die über temperaturabhängige Tryptophanfluoreszenzmessungen quantifiziert werden konnte. Dabei zeigte CsR-Arg83Gln eine um  $\sim 20^\circ\text{C}$  verringerte Thermostabilität gegenüber dem WT (Abb. 13A).



**Abbildung 13** **A** Temperaturwerte der Wendepunkte der beobachteten Tryptophanfluoreszenz bei CsR-WT (n=7) und Arg83Gln (n=4). **B** Western-Blot gegen C-terminalen His-Tag von CsR-Tyr57Lys Volllänge, exprimiert in drei verschiedenen *P. pastoris*-Klonen. **C** Chromophorregion des Absorptionsspektrums von rekombinantem CsR-Tyr57Lys aufgereinigt aus HEK293T-Zellen. Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) und Protein-zu-Chromophor-Verhältnis angegeben.

Die zweite Schlüsselposition, die für den Erhalt der Unidirektionalität ausgemacht wurde, ist das Tyr57. Es wurde anhand eines auf BR basierenden Homologiemodells angenommen, dass Tyr57 Arg83 mit Asp211 koppelt (Vogt *et al.*, 2015). Da aber in der Kristallstruktur eine von BR leicht verschiedene Orientierung des Arg83 beobachtet werden konnte (Abb. 12), die in einem Abstand des Arg83 zu Tyr57 von  $4,5 \text{ \AA}$  resultiert, muss die

Annahme einer direkten Interaktion der beiden Seitenketten neu evaluiert werden. Eine Kopplung kann hierbei über das benachbarte Wasser<sup>1</sup> realisiert werden (Appendix Abb. A1).

In der 2015 von Vogt et al. vorgelegten Studie wurde Tyr57 durch ein Lysin substituiert und zeigte bei negativen Haltespannungen unter neutralen und alkalischen Bedingungen reine passive Protonenströme (Vogt et al., 2015). Bei der heterologen Expression dieser Mutante in *Pichia pastoris* konnte keine Färbung der Zellpellets beobachtet werden (nicht gezeigt) und entsprechend kein funktionales Protein aufgereinigt werden, obwohl CsR-spezifische Banden im Western-Blot detektiert werden konnten (Abb. 13B). Geringe Mengen des CsR-Tyr57Lys (<5 µg / Kulturgefäß mit Ø 10 cm) mit inkorporiertem Retinal konnten aus HEK293T-Zellen aufgereinigt werden. Das Dunkelspektrum von CsR-Tyr57Lys ist in Abb. 13C dargestellt. Die äußerst instabile Mutante zeigte ihr Absorptionsmaximum bei 531 nm und war damit nur leicht hypsochrom gegenüber dem WT verschoben (vgl. Abschnitt 3.3.150). Diese geringe spektrale Verschiebung war so nicht zu erwarten, da Tyr57 entscheidend an der Konfiguration des Gegenionkomplexes beteiligt ist, was eindrucksvoll an der Kristallstruktur der BR-Tyr57Phe Mutante gezeigt werden konnte (Cao and Bowie, 2012). Des Weiteren wurde davon ausgegangen, dass die geladene Ammoniumgruppe der Lysinseitenkette die Polarität des Gegenionkomplexes stark beeinflussen würde. Eine durch starke Lichtstreuung bedingte Verfälschung des Spektrums kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Eine zu CsR veränderte Gegenionkonfiguration zeigen Proteorhodopsine, die ein konserviertes Histidin-Aspartat-Cluster besitzen, was am Beispiel von XR in Abbildung 12E dargestellt ist. In CsR befindet sich an der Position des Histidins ein Alanin. Die Substitution dieses CsR-Ala56 zu Histidin zeigte unter sauren extrazellulären Bedingungen ebenfalls einwärtsgerichtete Ströme, die auch bei dem Proteorhodopsin aus *Gloeobacter* (GR) festgestellt werden konnten (Vogt, Wietek and Hegemann, 2013; Vogt, 2017). Die spektroskopische Charakterisierung der CsR-Ala56His Mutante ist in Abschnitt 3.3.4 beschrieben.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Konfiguration des Gegenionkomplexes in Pumpen des BR-Typs zum Erhalt der Proteinstabilität und Unidirektionalität essentiell ist. Polaritätsänderungen in diesem Komplex oder auch auf der zytoplasmatischen Seite in der Nähe der RSB destabilisieren lichtgetriebene Pumpen und erlauben so genannte Leckströme (Vogt et al., 2015; Inoue, Nomura and Kandori, 2016). Der Gegenionkomplex von CsR zeigt dabei sehr hohe Homologien zur Konfiguration in BR auf. Dies legitimiert die Annahme, dass auch die ersten Photozyklusschritte, die vornehmlich diesen Komplex betreffen, sich in CsR und BR gleichen oder zumindest sehr ähnlich sind.

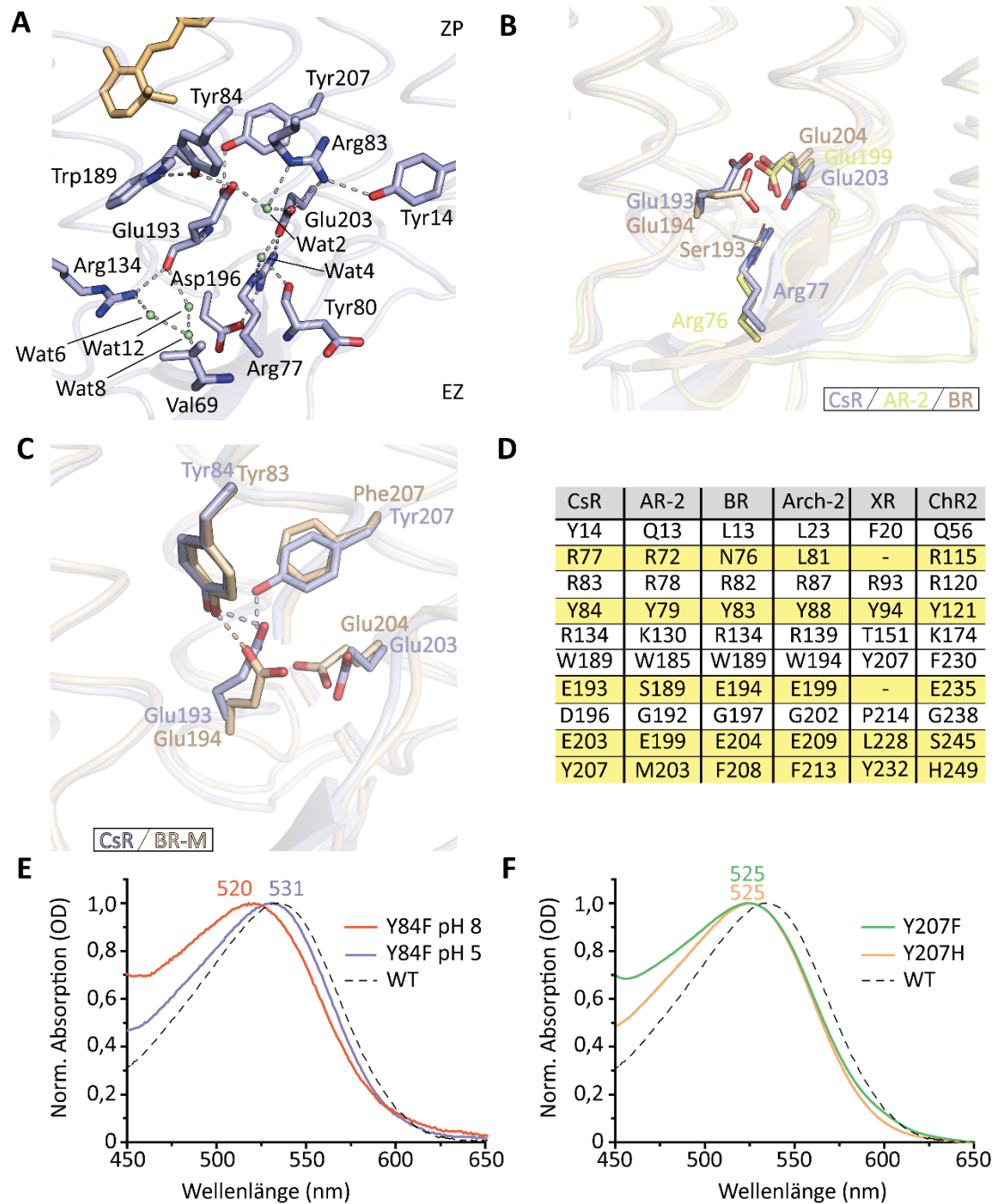
### 3.2.2.2 Protonenfreisetzungskomplex

Die genaue Herkunft des freigesetzten Protons in BR ist immer noch nicht abschließend geklärt (vgl. Abs. 1.3.1.1). Ein Grund dafür ist die Komplexität der vielen direkten und indirekten Wechselwirkungen innerhalb der polaren extrazellulären Hälfte. Abbildung 14A gibt einen Überblick über das H-Brückennetzwerk der extrazellulären Hälfte in CsR, das mit der Protonenfreisetzung assoziiert werden kann. Innerhalb dieses Netzwerkes finden sich fünf geordnete Wasser. Dabei wird Wasser2 durch H-Brücken mit Arg83, Glu193 und Glu203 stabilisiert. Wasser4 wechselwirkt mit Arg77, dem Rückgratsauerstoff des Tyr80 und Glu203. Diese Wasser entsprechen den geordneten Wassern 403 und 405 in BR (vgl. Abs. 1.3.1.2). Das in BR aufgelöste Wasser405 ist in CsR nicht vorhanden, was auf die verschiedenartige Konfiguration des PRC zurückzuführen ist, bei der Glu193 (Glu194 in BR) durch H-Brücken mit Tyr84 und Tyr207 in einer „aufgerichteten“ Konformation fixiert wird (Abb. 14A, B, C). Dadurch kommt es zum Aufbrechen, der in BR beobachteten Dyade der beiden Glutamatsäurereste Glu194 und Glu204 (Glu203 in CsR), die auch als Protonenfreisetzungsguppe (Englisch „proton release group“) bezeichnet wird (Sass *et al.*, 2000). Ein solches „Aufrichten“ von Glu194 wird bei BR nach der Deprotonierung der RSB im M-Intermediat beobachtet, wobei es zu der Ausbildung einer H-Brücke zwischen Glu193 und Tyr83 kommt (Sass *et al.*, 2000; Schobert, Brown and Lanyi, 2003; Nango *et al.*, 2016; Abb. 14C). Tyr84 ist in allen mikrobiellen Rhodopsinen hochkonserviert. Eine Substitution des Tyr84 zu Phenylalanin führte in CsR zu einer Blauverschiebung des Spektrums ( $\lambda_{\text{max Y84F}} = 521$  nm, Abb. 14E), die auch für BR beschrieben wurde (Mogi *et al.*, 1987). Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine potentielle Neuorientierung von Trp189 und damit eine Veränderung des elektrostatischen Potentials am  $\beta$ -Iononring des Retinals (vgl. Abs. 3.2.3). Bei Tyr207 handelt es sich um einen PR-typischen Rest, der in Proteorhodopsinen konserviert ist. Lichtgetriebene Pumpen aus Archaea besitzen an dieser Stelle ein Phenylalanin (Abb. 14D). Auch die Substitution des Tyr207 zu dem BR-typischen Phenylalanin resultierte in einer weiteren hypsochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums ( $\lambda_{\text{max-Y207F}} = 524$  nm, Abb. 14F) und somit einer Vergrößerung der spektralen Differenz der Dunkelzustandsabsorption von CsR und BR (vgl. Abb. 18A). Folgt man der vorhergehenden Argumentation, kann es durch das Wegfallen der H-Brücke zwischen dem OH von Tyr207 und Glu193 zu einer Neuausrichtung von Glu193 kommen, die auch die Konfiguration des Trp189 beeinflusst. Die Tatsache, dass die stationären Absorptionsunterschiede trotz der scheinbaren strukturellen Angleichung von CsR und BR vergrößert wurden war so nicht zu erwarten.

An dieser Stelle muss somit darauf hingewiesen werden, dass der phänomenologische Vergleich zwischen BR und CsR zwar notwendig und richtig ist, allerdings in Hinblick auf



Konsistenz, mögliche Unterschiede durch weitere sekundäre Effekte berücksichtigt werden müssen.



**Abbildung 14** **A** Ausschnitt des H-Brückennetzwerkes in der extrazellulären Hälfte von CsR. Geordnete Wasser (grüne Kugeln, abgekürzt als Wat aus Englisch „water“) und H-Brückenbindungen in einem Abstand  $\leq 3 \text{ \AA}$  (graue Striche) dargestellt. **B** Überlagerung wichtiger Reste des PRC von CsR (hellblau), AR-2 (gelb, PDB: 3AM6) und BR (hellbraun, PDB: 1C3W). **C** Überlagerung von CsR (blau) mit einer M-Intermediatsstruktur von BR (hellbraun, PDB: 1C8S). Darstellung der näher besprochenen Reste. **D** Strukturbasierter Sequenzvergleich (PROMALS3D; Pei, Kim and Grishin, 2008) der in A dargestellten Reste verschiedener BR-typischer Protonenpumpen. XR als PR-typische Protonenpumpe und ChR2 als Vertreter kationselektiver Kanalrhodopsine mitaufgeführt. **E** Normierte Absorptionsspektren der CsR-Y84F Mutante bei pH 8 (rot) und pH 5 (blau). **F** Normierte Absorptionsspektren der CsR-Y207F (grüne Linie) und CsR-Y207H (orangene) Mutanten bei pH 8. Zahlen in der entsprechenden Farbe geben  $\lambda_{\text{max}}$  an. CsR-WT als Referenz (gestrichelt) dargestellt.

Die Einführung eines Histidins (Tyr207His), welches nativ in kationselektiven Kanalrhodopsinen vorliegt (Abb. 14D), induzierte lichtgetriebene passive Protonenströme (Vogt, 2017). Das rekombinante Protein war jedoch instabil und zeigte eine lichtinduzierte Hydrolyse des Retinalchromophors (nicht gezeigt).

Während das Glu193 in CsR zum Proteinkern orientiert ist, ist Glu203 im Vergleich zu dem korrespondierenden Glu204 in BR zum extrazellulären Raum geneigt (Abb. 14B), wo es eine Salzbrücke mit Arg77 ausbildet (Abb. 14A, B). Diese Arg-Glu-Wechselwirkung wird auch in AR-1 (Arg80/Glu206, Furuse *et al.*, 2015) und AR-2 (Arg72/Glu199, Abb. 14B) beobachtet. In den Rhodopsinen aus *Acetabularia* ist allerdings das zweite Glutamat (analog zu Glu193 in CsR) nicht vorhanden und durch Ala196 in AR-1 bzw. Ser189 in AR-2 ersetzt. Eine Konfiguration wie sie bei CsR beobachtet wird, ist daher für lichtgetriebene Pumpen bis jetzt einzigartig. Zwar besitzt auch CR-3 ein Arginin (Arg74) im extrazellulären  $\beta$ -Faltblattmotiv, dieses wechselwirkt jedoch nicht mit dem zu CsR äquivalenten Glu203 (Glu208 in CR-3, Chan *et al.*, 2014). Sequenzvergleiche zu CarO, einer lichtgetriebenen Protonenpumpe aus dem Pilz *Fusarium fujikuroi*, lassen die Vermutung zu, dass auch dort die in CsR beobachtete Arg-Glu-Wechselwirkung auftreten könnte (Garcia-Martinez *et al.*, 2015). Inwieweit dies tatsächlich der Fall ist, lässt sich ohne eine Kristallstruktur des CarO jedoch nicht beantworten. Neben der Wechselwirkung mit Glu203 bildet Arg77 eine H-Brücke zu Asp196 im extrazellulären Loop zwischen Helix 6 und 7 aus und trägt somit zur Stabilisierung von Helix 7 bei, die unter anderem auch das zweite Gegenion Asp211, sowie Lys215, über welches das Retinal kovalent gebunden wird, beinhaltet. An dieser Stelle sei bereits erwähnt, dass eine Substitution des Arg77 zu Glutamin Veränderungen im Photozyklus verursacht, die eine Beeinflussung des Gegenionkomplexes suggerieren. Die Photochemie von CsR-Arg77Gln wird in Abschnitt 3.3.3 näher besprochen.

Trotz der oben besprochenen Orientierung des Glu203 zur extrazellulären Grenzfläche, wird eine Salzbrücke zwischen Arg83 und Glu203 ausgebildet. Diese direkte Wechselwirkung zwischen beiden Resten tritt interessanterweise in AR-1, aber nicht in AR-2 auf (Wada *et al.*, 2011; Furuse *et al.*, 2015). Auch in keiner der acht anderen Dunkelzustandsstrukturen lichtgetriebener Pumpen vom BR-Typ ist diese Wechselwirkung vorhanden (Gushchin and Gordeliy, 2018). Ein Grund dafür ist die einzigartige Konfiguration von Arg83, das eine H-Brücke zum 3 Å entfernten nicht konservierten Tyr14 in Helix 1 ausbildet (Abb. 14A). Dies ist die einzige interhelikale H-Brücke zwischen Helix 1 und 3. Der Einfluss dieser Wechselwirkung auf den Photozyklus wurde indirekt mithilfe der Mutante CsR-Tyr14Phe untersucht und ist in Abschnitt 3.3.6 beschrieben. Ebenfalls wurde diese Wechselwirkung als Ausgangspunkt neuer strukturbasierter Kanalmutanten des CsR verwendet, die in Abschnitt 3.4 besprochen werden.

Die übrigen geordneten Wasser des besprochenen H-Brückennetzwerkes sind die sich

bereits im extrazellulären Raum befindlichen Wasser 6, 8 und 12 (Abb. 14A). Dabei wird Wasser<sub>8</sub> über das Rückgratsauerstoff von Val<sub>69</sub> und Wasser<sub>12</sub> über das Rückgratsauerstoff von Glu<sub>193</sub> fixiert. Wasser<sub>6</sub> bildet eine H-Brücke zu Arg<sub>134</sub> aus, welches wiederum eine weitere H-Brücke zum Rückgratsauerstoff von Glu<sub>203</sub> ausbildet. Arg<sub>134</sub> ist in prokaryotischen lichtgetriebenen Protonenpumpen konserviert, jedoch in AR-2 und ChR2 durch ein Lysin substituiert (Abb. 14D). BR-Mutanten, in denen das korrespondierende Arg<sub>134</sub> durch Lysin oder Histidin ersetzt wurde, zeigten veränderte Kinetiken der Protonenfreisetzung, die mit einer Modulation des  $pK_s$ -Wertes des PRC in Verbindung gebracht wurden (Stern and Khorana, 1989; Misra *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2000). Allerdings wurde Arg<sub>134</sub> trotz hoher Konservierung, im Vergleich zu anderen Komponenten des PRC, wie beispielsweise dem Glutamatpaar Glu<sub>194</sub> und Glu<sub>204</sub> in BR, nur begrenzt untersucht.

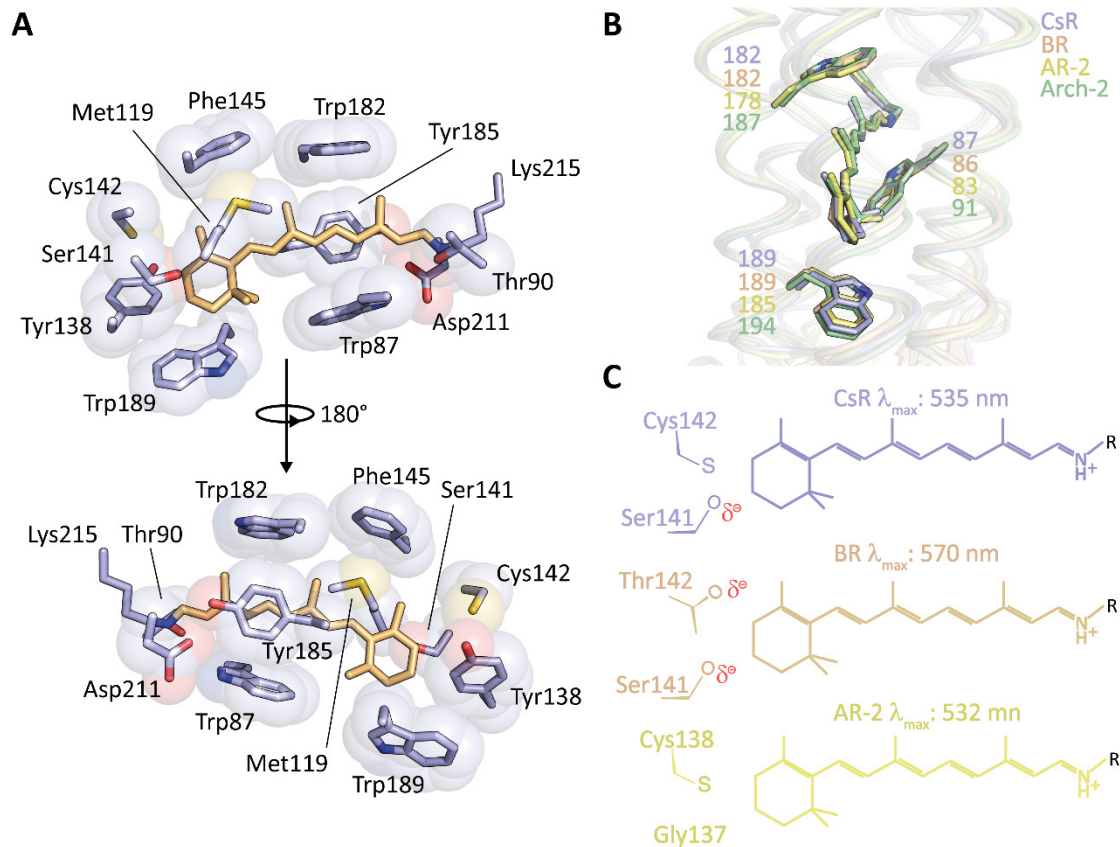
Abschließend lässt sich sagen, dass sich der PRC von CsR trotz hoher Sequenzhomologie zu BR und anderen lichtgetriebenen Pumpen strukturell wesentlich von anderen Pumpen unterscheidet. Dabei vereint CsR BR-typische Reste wie das Glutamatpaar (Glu<sub>193/203</sub>) ebenso wie Tyr<sub>207</sub>, das sonst nur in PR-typischen Pumpen vorkommt. Die Wechselwirkung des Arg<sub>77</sub> mit Glu<sub>203</sub> wiederum ist aus Rhodopsinen der Schirmalge *Acetabularia* bekannt. Die H-Brücke von Arg<sub>77</sub> mit dem nichtkonservierten Asp<sub>196</sub> hingegen, ist ebenso einzigartig wie die beobachtete Wechselwirkung des Arg<sub>83</sub> mit dem nichtkonservierten Tyr<sub>14</sub>. Der in diesem Abschnitt beschriebene Aufbau des PRC macht deutlich, dass eine weiterführende mechanistische Untersuchung von Pumpströmen notwendigerweise durch strukturelle Informationen unterstützt werden muss.

### 3.2.3 Retinalbindetasche

Maßgeblich für die Absorptionseigenschaften eines Rhodopsins ist die elektrostatische Konfiguration der so genannten Retinalbindetasche. Diese wird durch die Gesamtheit der sich in der Nähe zum Retinal befindenden Seitenketten moduliert. Aber auch die räumliche Anordnung dieser Seitenketten hat durch sterische Interaktionen Einfluss auf Absorptionseigenschaften, die Reaktionskinetik und die Isomerenzusammensetzung des Proteins. Ein Überblick der Retinalbindetasche von CsR ist in Abbildung 15A gegeben. Die dort aufgeführten Reste sollen im Kontext anderer lichtgetriebener Pumpen, vorrangig BR, beschrieben werden, um Rückschlüsse auf molekulare Eigenschaften von CsR zu ermöglichen.

Die Retinalbindetasche von CsR besteht aus den unpolaren Resten: Met<sub>119</sub>, Cys<sub>142</sub>, den polaren Resten: Thr<sub>90</sub>, Ser<sub>141</sub>, Asp<sub>212</sub> und den aromatischen Resten: Trp<sub>87</sub>, Tyr<sub>138</sub>,

Phe145, Trp182 und Trp189 (Abb. 15A). Die drei Tryptophane Trp87, Trp182 und Trp189 sind bei lichtgetriebenen Protonenpumpen vom BR-Typ konserviert (vgl. Abb. 6).



**Abbildung 15** A Retinalbindetasche und beteiligte Reste in CsR. Sphären um die jeweiligen Atome repräsentieren den van-der-Waals-Radius. B Überlagerung von CsR (hellblau), BR [PDB: 1C3W] (hellbraun), AR-2 [PDB: 3AM6] (gelb) und Arch-2 [PDB: 3WQJ] (grün). Positionsziffer der konservierten Tryptophane der Retinalbindetasche gelistet. C Vergleich der Polarität in Nähe des  $\beta$ -Iononringes anhand zweier Reste für CsR (hellblau), BR (hellbraun) und AR-2 (gelb). Maximale Absorption des Proteins unter neutralen pH-Bedingungen angegeben (BR: Abs. 3.3.1.1, AR-2: Wada *et al.*, 2011).

Abbildung 15B zeigt eine Überlagerung der Tryptophane bei verschiedenen lichtgetriebenen Pumpen, die verdeutlicht, wie diese drei sperrigen Aminosäuren das Retinal in seiner Konfiguration fixieren. Substitutionen dieser Reste zu Phenylalanin in BR induzierten starke hypsochrome Verschiebungen der Proteinabsorption (Mogi, Marti and Khorana, 1989), wobei BR-Trp182Phe mit einer Verschiebung von 70 nm den größten Effekt aufzeigte. Zeitaufgelöste spektroskopische Studien an dieser Mutante zeigten weiterhin einen stark verlangsamten Photozyklus mit außerordentlich langen Lebenszeiten des N-Intermediates im Bereich von Sekunden (Weidlich *et al.*, 1996). Daraus wurde geschlossen, dass die sterische Interaktion des Trp182 mit der C9-Methylgruppe des Retinals die Reisoomerisierung des Chromophors treibt. Ebenso initiiert die Deprotonierung des Chromophors durch eine veränderte Orientierung der C9-Methylgruppe zu Trp182 Konformationsänderungen der

zytoplasmatischen Hälfte, die zur Ausbildung des zytoplasmatischen Halbkanales führen. Eine ähnliche sterische Wechselwirkung wurde Met118 in BR (Met119 in CsR) attestiert. Dabei zeigten Mutagenestudien, dass die Substitution des Met118 zu Alanin oder Cystein den Photozyklus stark verlangsamten, was auf eine fehlende Interaktion mit der C9-Methylgruppe des Retinals zurückgeführt wurde (Greenhalgh *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1994). Aufgrund einer homologen räumlichen Orientierung von Trp182, sowie der Konservierung des Met119 (Abb. 15A, B), ist bei CsR von ähnlichen sterischen Wechselwirkungen dieser Reste mit dem Retinalmolekül auszugehen.

Trp189 hingegen zeigt im Vergleich zu Trp87 und Trp182 in den verschiedenen Pumpen eine minimale Variabilität seiner Konformation. Für BR wurde gezeigt, dass es während des M-Intermediates zu einer Neuorientierung von Trp189 kommt, die die hydrophoben Wechselwirkungen des Restes mit dem  $\beta$ -Iononring verstärken (Asakawa, Masuda and Takeuchi, 2006). Dass diese Wechselwirkungen einen signifikanten Einfluss auf die Absorptionseigenschaften des Proteins haben können, wurde in Abschnitt 3.2.2.2 bereits thematisiert. Studien an Kanalrhodopsin zeigten ebenfalls auf, dass durch sterischen Druck auf den  $\beta$ -Iononring, die Koplanarität des Moleküls gestört werden kann, was große spektrale Verschiebungen bedingt (Kato, Kamiya, *et al.*, 2015).

Zwei weitere Reste, die mit dem  $\beta$ -Iononring interagieren, sind Ser141 und Cys142. Diese Reste treten durch die Polarität ihrer Seitenketten in elektrostatische Wechselwirkung zum Chromophor. Im elektronisch angeregten Zustand eines Rhodopsins mit RSBH<sup>+</sup> kommt es zu einer Ladungsumverteilung über den Chromophor, was zu einer Polarisierung des Retinals führt, in der die im elektronischen Grundzustand an der RSBH<sup>+</sup> lokalisierte positive Ladung in Richtung des  $\beta$ -Iononringes verschoben wird und dieser daher partiell positiv geladen wird (Mathies and Stryer, 1976; Schenkl *et al.*, 2005). Entsprechend kann im angeregten Zustand die delokalisierte positive Partialladung am  $\beta$ -Iononring durch sich in der Nähe befindliche polare Reste stabilisiert werden. Aufgrund der energetischen Stabilisierung des angeregten Zustandes kommt es zu einer Verringerung der Energiedifferenz des elektronischen Grund- und des ersten elektronisch angeregten Niveaus, die sich in einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums äußert. Die Substitution des Ser141 zu Glycin in CsR resultierte im Umkehrschluss in einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums um 11 nm (vgl. Abb. 28B). Mutagenesestudien an BR in denen Ser141 gegen Alanin oder Thr142 gegen Valin ausgetauscht wurden, zeigten vergleichbare spektrale Verschiebungen auf (Marti *et al.*, 1991). Auch eine Mutation des in *Gloeobacter violaceus* Rhodopsin (GR) analogen Ser181 zu Glycin resultierte in einer hypsochromen Verschiebungen des Spektrums um 10 nm (Engqvist *et al.*, 2015), was die Universalität dieser Wechselwirkung unterstreicht. Bemerkenswerterweise verursachte die Substitution des Ser141 in BR zu

Cystein eine der stärksten, je beobachteten hypsochromen Verschiebungen von 82 nm ( $\lambda_{\text{max}} = 468$  nm, Marti *et al.*, 1991). Allerdings wird aus den in Abbildung 15C schematisch dargestellten Konfigurationen der verschiedenen Pumpen erkennbar, dass der Einfluss der sich in der Nähe zum  $\beta$ -Iononringes befindenden Reste auf die Absorption des Retinals nicht isoliert betrachtet werden darf. BR, das zwei negative Seitenketten (Ser141 und Thr142) an dieser Stelle besitzt, hat zwar tatsächlich eine um 35 nm bathochrom verschobene Absorption gegenüber CsR, AR-2 auf der anderen Seite, das keine polare Seitenkette in Nähe des  $\beta$ -Iononring aufweist (Gly137 und Cys138) zeigt hingegen seine maximale Absorption bei 532 nm (Wada *et al.*, 2011) und ist damit im Vergleich zu CsR lediglich um 3 nm blauverschoben. Entsprechend muss für eine konsistente Betrachtung die Gesamtkomposition der Retinalbindetasche und des Gegenionkomplexes beachtet werden.

Ein weiterer nichtkonservierter Rest in der Umgebung des  $\beta$ -Iononring in CsR ist Tyr138. Die Substitution des Tyr138 zu Alanin zeigte allerdings keinen Einfluss auf die Dunkelzustandsabsorption von CsR (Appendix Abb. A2).

Für den nichtkonservierten Rest Phe145 hingegen kann in Analogie zu BR ein starker Einfluss auf stationäre Absorption von CsR erwartet werden. Dieser in BR durch Met145 besetzten Position, wurde wie bereits erwähnt, eine Schlüsselrolle in der Dunkeladaptation des Proteins zugeschrieben (Ihara *et al.*, 1985). Die Einführung eines Phenylalanin an Position Met145 in BR, wie es nativ in CsR zu finden ist, führte zu einem starken Anstieg des all-*trans*-Isomers im dunkeladaptierten Protein und verschob das Absorptionsmaximum hypsochrom um 10 nm (Ihara *et al.*, 1985).

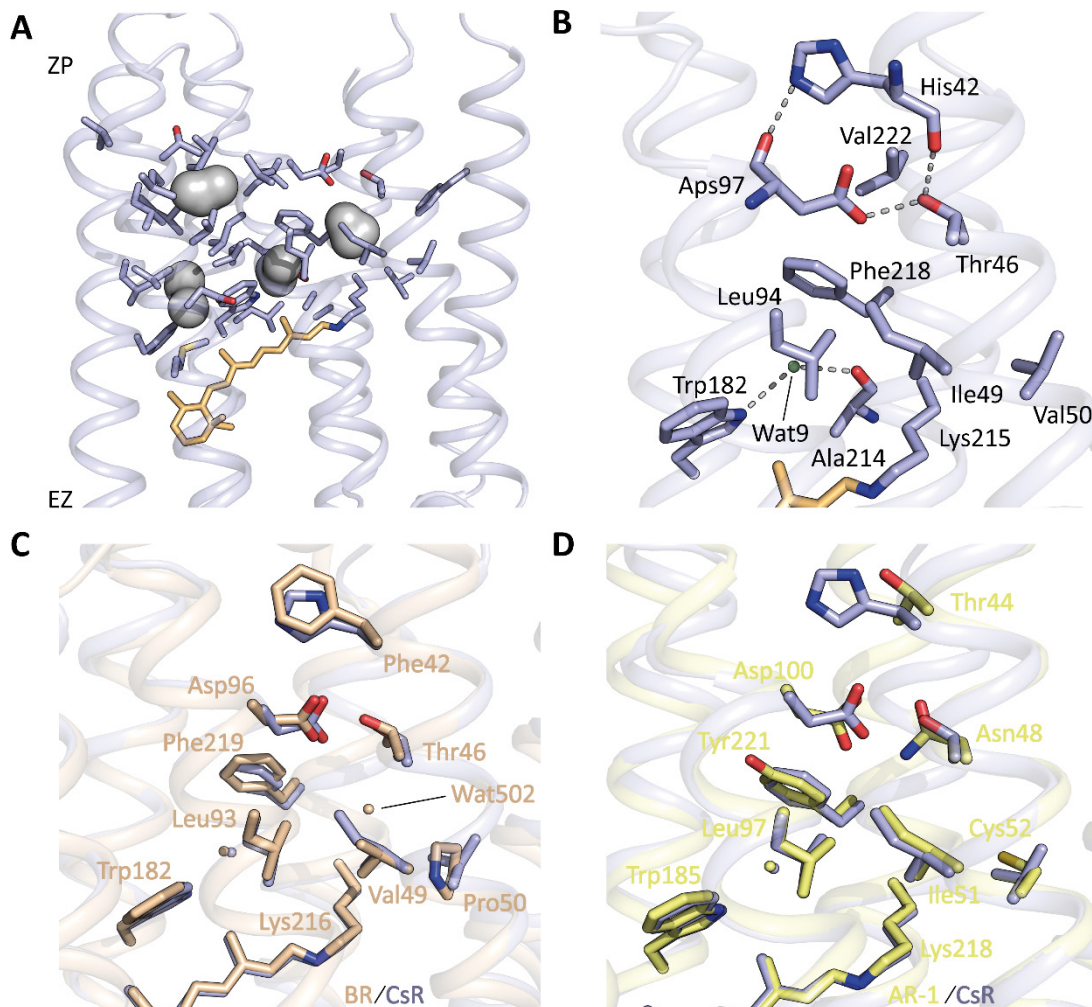
Als letzte funktionale Gruppe der Retinalbindetasche sind die zum Gegenionkomplex gehörenden konservierten Reste Thr90, Tyr185 und Asp212 zu nennen. Hochdurchsatzstudien an GR demonstrierten, dass die Substitution jeder dieser Reste durch unpolare Seitenketten zu einer Rotverschiebung der Dunkelzustandsabsorption führte (Engqvist *et al.*, 2015), was durch eine destabilisierte Ladungstrennung zwischen der RSBH<sup>+</sup> und den Gegenionen erklärt werden kann. Allerdings zeigten diese Studien auch, dass mit Ausnahme des zu Thr90 korrespondierenden Thr125, alle Mutationen der konservierten Reste des Gegenionkomplexes zu einer Beeinträchtigung bis hin zu einer vollständigen Stilllegung der Pumpleistung führten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reste der Retinalbindetasche des CsR weitestgehend konserviert sind. Einzelne Reste können allerdings großen Einfluss auf die Absorptionseigenschaften, die Isomerenzusammensetzung und die Kinetik des Proteins haben, die Unterschiede von CsR zu anderen lichtgetriebenen Pumpen erklären.



### 3.2.4 Zytoplasmatische Hälfte

Die zytoplasmatische Hälfte auswärtsgerichteter lichtgetriebener Pumpen unterscheidet sich in ihren strukturellen Eigenschaften deutlich von der extrazellulären Hälfte. Der zytoplasmatische Teil von CsR etwa beherbergt vergleichsweise wenig polare Seitenketten und wird vorrangig über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Dadurch ist die zytoplasmatische Hälfte thermisch „nachgiebiger“ als die steife extrazelluläre Hälfte und erlaubt durch konformationelle Änderungen die Ausbildung eines Kanals zur Reprotonierung der RSB (Zaccai, 2000). In Abbildung 16A ist eine Übersicht berechneter Kavitäten in der zytoplasmatischen Hälfte von CsR dargestellt. Die mit den Kavitäten assoziierten Reste zeigen dabei deutlich den hydrophoben Charakter der zytoplasmatischen Hälfte der Transmembrandomäne auf.



**Abbildung 16** **A** Oberfläche mittels HOLLOW (Ho and Gruswitz, 2008) berechneter Kavitäten und assoziierter Reste der zytoplasmatischen Hälfte von CsR. **B** Detaillierte Ansicht des zytoplasmatischen Halbkanals. H-Brückenbindungen sind als graue Striche und Wassermoleküle als grüne Kugeln dargestellt. C $\alpha$ -Überlagerung des CsR (hellblau) mit BR (hellbraun) [PDB: 1C3W] (**C**) bzw. AR-1 (gelb) [PDB: 5AWZ] (**D**). Aminosäuren analog BR (**C**) bzw. AR-1 (**D**) Nomenklatur beschriftet.

Das einzige geordnete Wasser innerhalb dieser hydrophoben Kavitäten ist Wasser<sup>9</sup>, das über den Indolstickstoff von Trp182 und das Rückgratsauerstoff von Ala214 fixiert wird (Abb. 16B). Ein zweites geordnetes Wasser wie es für BR beobachtet wurde (Wasser<sup>502</sup>, Abb. 16C), ist in CsR nicht vorhanden (Abb. 16B, C). An dessen Stelle befinden sich die beiden hydrophoben Aminosäuren Ile49 und Val50 (Val49 und Pro50 in BR), was unweigerlich zu einem veränderten Volumen und einer erhöhten Hydrophobizität dieses Kompartimentes führt. Eine ähnliche Konfiguration ist auch in AR-1 vorhanden, wo dieses zweite Wasser ebenfalls nicht identifiziert werden konnte (Abb. 16D). Weiterhin bildet das in Pumpen vom BR-Typ als Protondonor der RSB konservierte Asp97 (Asp96 in BR) eine H-Brücke zu dem 2,6 Å entfernten Thr46 (Abb. 16B) aus. Diese Wechselwirkung, die auch in BR vorhanden ist (Abb. 16C), ist für die Modulation des  $pK_s$ -Wertes von Asp97 mitverantwortlich (vgl. Abs. 1.3.1.1). In AR-1 wechselwirkt der primäre Protondonor Asp100 mit Asn48, was ebenso wie die räumliche Nähe zu Tyr221 (Phe218 in CsR) zu einer Erniedrigung des  $pK_s$ -Wertes des Protonendonors führt (Abb. 16D; Furuse *et al.*, 2015). Interessanterweise führte in CsR die Substitution des Thr46 mit Asparagin (analog zu AR-1) zu einer reduzierten Spannungsabhängigkeit (Vogt, 2017).

Ein nichtkonservierter Rest des zytoplasmatischen Halbkanals ist His42. Es sitzt in CsR oberhalb des Asp97 an der Grenzfläche zum Zytoplasma und formt eine H-Brücke zu dem 2,6 Å entfernten Rückgratsauerstoff des Asp97 (Abb. 16B). In BR findet sich an dieser Stelle ein Phenylalanin. Diesem Phe42 wurde die Funktion eines kappenartigen Verschlusses des zytoplasmatischen Halbkanals zugeschrieben, der vor der Reprotonierung Asp96 von der zytoplasmatischen Oberfläche abschirmt (Rouhani *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014). Histidine hingegen sind in einer Vielzahl verschiedener Proteine sowohl als Protonenshuttle als auch als Sensoren beschrieben worden, die pH-abhängig ihre Konformation ändern können (Rajan *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2007; Kalani *et al.*, 2013). In dem spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv2.1. zum Beispiel, ist die Seitenkette eines Histidins durch schnelle Rotamerwechsel in der Lage Protonen aus dem Protein nach außen zu transportieren (Long *et al.*, 2007). Untersuchungen durch Elisabeth Lettau (Humboldt-Universität zu Berlin) an der CsR-His42Ala Mutante demonstrierten unter neutralen pH-Bedingungen eine verringerte Akkumulation des M-Intermediates, die durch eine beschleunigte Reprotonierung der RSB erklärt werden kann (Lettau, 2018). Allerdings destabilisierte diese Mutation das Protein. Da die H-Brückenbindungen zwischen His42/Thr46 und Asp97 die einzigen polaren interhelikalen Wechselwirkungen zwischen Helix 2 und 3 darstellen, ist es nicht auszuschließen, dass der Austausch von His42 gegen das kleinere, unpolare Alanin zu großen konformationellen Änderungen innerhalb des zytoplasmatischen Halbkanals führte. Weitere nicht zur Transmembrandomäne gehörende Reste der



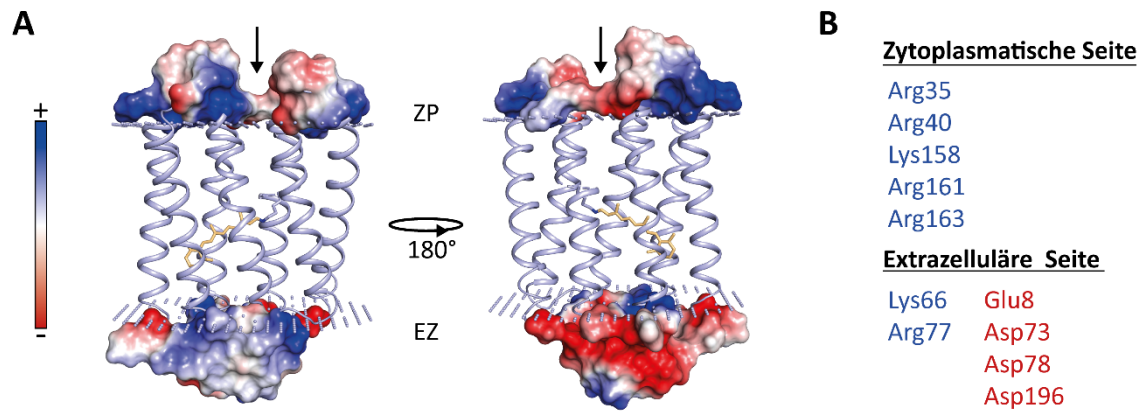
zytoplasmatischen Hälfte werden im folgenden Abschnitt betrachtet.

### 3.2.5 Oberflächenladungen

Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Membranen und Proteinoberflächen sind maßgeblich an der Topologie und Struktur von Membranproteinen beteiligt. Während der Einbau hydrophober  $\alpha$ -helikaler Segmente durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den unpolaren Kohlenwasserstoff-Resten der Lipide bestimmt wird, orientieren positive Ladungen das Protein zur Membranebene nach der „positiv-innen Regel“ (aus dem Englischen "*positive-inside rule*"; Elazar *et al.*, 2016). Abbildung 17A zeigt die elektrostatische Ladungsverteilung der Oberflächenladungen von CsR. Durch Modellierung der Membranständigkeit von CsR war es möglich Aminosäurereste, die in Kontakt mit dem extrazellulären beziehungsweise zytoplasmatischen Medium stehen, zu identifizieren. Auffallend dabei ist, dass an der zytoplasmatischen Oberfläche des Proteins ausschließlich positiv geladene Seitenketten vorzufinden sind (Abb. 17B). Dies steht in deutlicher Diskrepanz zur zytoplasmatischen Oberfläche von BR wo sich fünf Carboxylate (Asp36/38/102/104 und Glu166) finden. Diese negativ-geladenen Seitenketten wurden als möglicher Antennenkomplex interpretiert, der im Laufe des Photozyklus Protonen anzuziehen vermag und so eine effiziente Reprotonierung des primären Protonendonors Asp96 erlaubt (Checover *et al.*, 2001; Nachliel *et al.*, 2002). Besonders Asp38 wurde als essentieller Rest eines so genannten „Protonen-Aufnahme-Komplexes“ (PUC, aus dem Englischen „proton uptake complex“) diskutiert (Riesle *et al.*, 1996; Lorenz-Fonfria *et al.*, 2017). In CsR ist die korrespondierende Position durch Arg40 besetzt. Da der  $pK_s$ -Wert der Guanidingruppe in Lösung bei  $\sim 12$  liegt, ist die Reprotonierung des Asp97 über diesen Rest ausgeschlossen. Interessanterweise zeigt sich auf der zytoplasmatischen Seite der berechneten elektrostatischen Potentialen eine isolierte „Einbuchtung“ (Abb. 17A, schwarzer Pfeil). An dieser Position sitzt das im vorhergehenden Abschnitt beschriebene His42. Das negative elektrostatische Potential über diesem Areal wird vornehmlich durch den Rückgratsauerstoff des His226 erzeugt. Die Seitenkette von His226 war nicht geordnet und konnte entsprechend nicht in der Kristallstruktur aufgelöst werden, was für einen hohen konformationellen Freiheitsgrad dieses Restes spricht.

Anders als auf der zytoplasmatischen Seite, treten viele der polaren Reste der extrazellulären Seite in direkte Wechselwirkungen miteinander und tragen damit wahrscheinlich zur Modulation der Protonenfreisetzung bei. Die Wechselwirkung zwischen

Lys66 und Asp73 dient allerdings vornehmlich der Stabilisierung der extrazellulären Domäne. Elektrophysiologische Messungen an CsR-Lys66Leu zeigten keine Unterschiede zum WT auf (private Mitteilung Christiane Grimm, Humboldt-Universität zu Berlin). Glu8 ist im hohen Maß flexibel und konnte in der Kristallstruktur nicht aufgelöst werden.



**Abbildung 17 A** Durch APBS (Baker *et al.*, 2001) berechnete elektrostatische Potentiale der Oberflächenladungen im Vakuum. Abgrenzung zur Transmembrandomäne durch OPM-Server bestimmt und durch graue Kugeln dargestellt. Skalierung der Färbung durch den Balken links abgebildet. **B** Tabellarische Zusammenfassung der geladenen Reste der Oberfläche auf der jeweiligen Seite des Proteins.

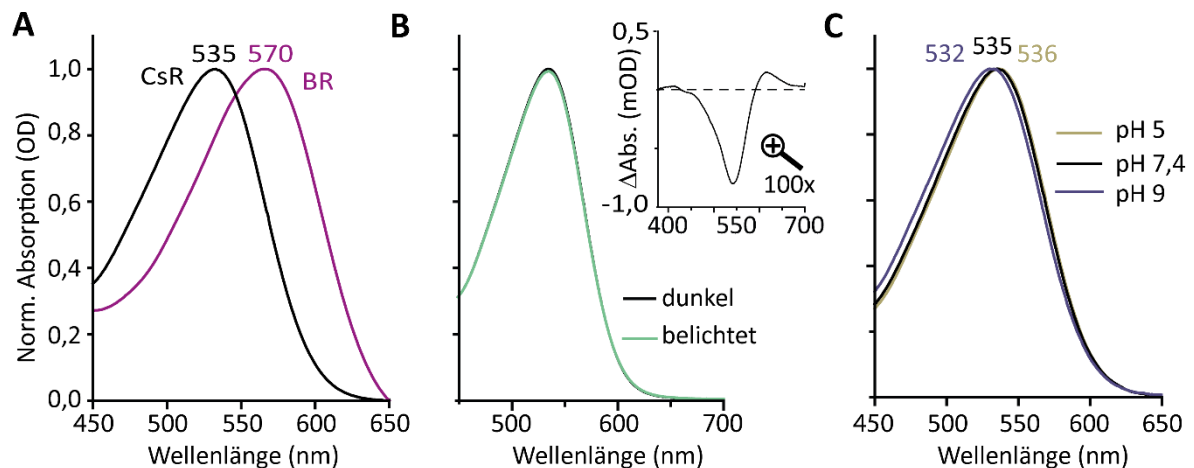
Welche Rolle die polaren Gruppen der Proteinoberfläche auf den Protonentransport des CsR haben, wurde in dieser Arbeit nicht explizit untersucht. Ein möglicher Antennenkomplex, wie er für BR postuliert wurde, kann jedoch ausgeschlossen werden. Mutagenesestudien an der lichtgetriebenen auswärtsgerichteten Natriumpumpe KR2 deuten darauf hin, dass die Reste der zytoplasmatischen Oberfläche vorrangig die Selektivität der Pumpe beeinflussen (Kato, Inoue, *et al.*, 2015; Konno *et al.*, 2016). Im Fall von CsR muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Protonenselektivität durch die Reste des zytoplasmatischen Halbkanals, insbesondere Asp97 gewährleistet wird. Inwieweit Reste der extrazellulären Seite zur geringen pH-Abhängigkeit von CsR beitragen, wird gesondert in Abs. 4.2.1 diskutiert.

### 3.3 Spektroskopische Charakterisierung

#### 3.3.1 CsR-Wildtyp

##### 3.3.1.1 Stationäre Absorptionseigenschaften von CsR

Isoliertes CsR zeigt bei pH 7,4 eine maximale Absorption bei 535 nm (Abb. 18A). Das Spektrum ist dabei in Übereinstimmung zu dem elektrophysiologisch bestimmten Aktionsspektrum (Vogt *et al.*, 2015) und zeigt keine Unterschiede zum Dunkelspektrum des Vollängenkonstruktes auf (Appendix Abb. A3). Im Vergleich zu BR ( $\lambda_{\text{max}} = 570$  nm, Abb. 18A) ist CsR um etwa 35 nm bathochrom verschoben. Da der Gegenionkomplex beider Proteine nahezu identisch ist (vgl. Abb. 12), kann der große Absorptionsunterschied vorrangig durch Unterschiede in der Konfiguration der Retinalbindetasche erklärt werden. Unterschiede innerhalb dieses Segmentes wurden bereits in Abschnitt 3.2.3 näher erörtert und sind mit der in CsR beobachteten Blauverschiebung konsistent.



**Abbildung 18** **A** Normierte stationäre Absorptionsspektren von CsR (schwarz) und BR (violett, zur Verfügung gestellt durch Dr. Meike Luck, Humboldt-Universität zu Berlin) bei pH 7,4 (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,03 % DDM). **B** Absorptionsspektren von CsR nach 8 Std. Dunkeladaptation (schwarz) und darauffolgender Belichtung (grün, 30 s, 530 nm LED). 100x Vergrößerung des Differenzspektrums (Licht – Dunkel, Einschub). **C** Normierte stationäre Absorptionsspektren von CsR bei pH 5 (hellbraun, 20 mM MES, 150 mM NaCl, 0,03 % DDM), pH 7,4 (schwarz, Puffer wie in A) und pH 9 (blau, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,03 % DDM). Wellenlänge der maximalen Absorption in der jeweiligen Farbe angegeben.

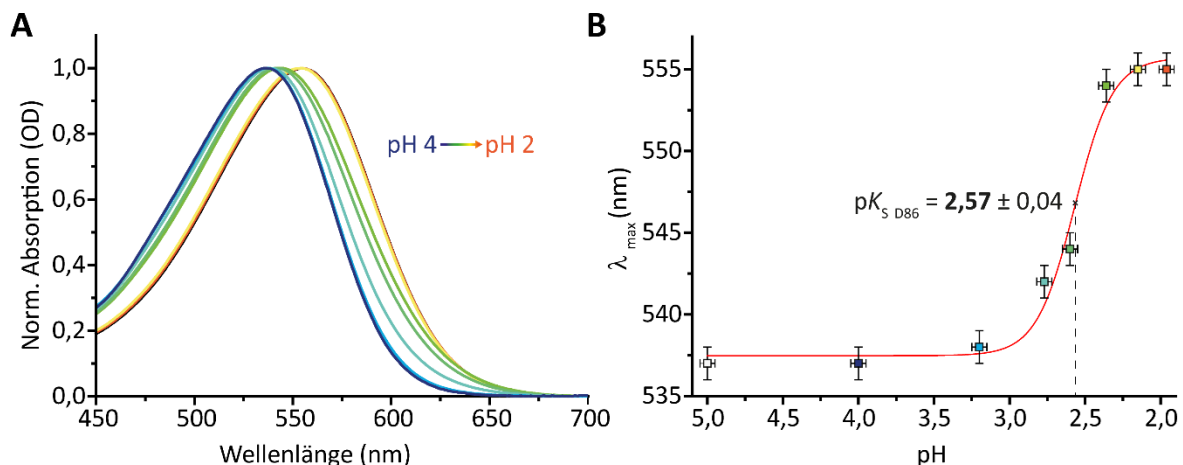
Aus den in Abbildung 18B dargestellten Spektren wird ersichtlich, dass CsR eine nur vernachlässigbar kleine Lichtadaptation zeigt und sich in dieser Hinsicht deutlich von BR, wo es nach Belichtung zu einer starken Anreicherung einer bathochrom verschobenen Absorption kommt, unterscheidet (Oesterhelt, Meentzen and Schuhmann, 1973).

CsR zeigt eine geringe pH-Abhängigkeit seiner Dunkelabsorption (Abb. 18C) mit maximaler Absorption bei 532 nm für pH 9, 535 nm bei pH 7,4 und 536 nm bei pH 5. Da die

RSBH<sup>+</sup> über ein ausgedehntes H-Brückennetzwerk mit dem extrazellulären Raum verbunden ist (vgl. Abb. 12A und Abb. 14A), sind Kopplungseffekte zwischen den Aminosäuren an der extrazellulären Oberfläche und dem Gegenionkomplex möglich. Die geringe protochrome Verschiebung im Bereich von pH 5 bis pH 9 deutet allerdings darauf hin, dass die elektrostatische Konfiguration des Gegenionkomplexes im Dunkelzustand innerhalb dieses pH-Bereiches weitestgehend unverändert bleibt.

### 3.3.1.2 *pK<sub>s</sub> des primären Protonakzeptors Asp86*

Der Verlauf der protochromen Farbverschiebung im Bereich von pH 5 - 2 lässt sich mithilfe einer pH-Titration quantifizieren (Abb. 19A). Während für CsR bei pH 5 die maximale Absorption bei 536 nm beobachtet wird, verschiebt sich diese sukzessiv zu 556 nm bei pH 2. Die nominell größte Veränderung hierbei wird zwischen ~pH 3 und ~pH 2,4 registriert (Abb. 19B).



**Abbildung 19** **A** Normierte Absorptionsspektren von rekombinantem CsR in (detergenzhaltigem) Puffer mit verschiedenen pH-Werten (pH 4→pH 2). **B** Titrationskurve (pH vs. λ<sub>max</sub>) von CsR. Daten aus A. Messwert bei pH 5 aus Abb. 18C. Fehlerbalken zeigen Messunsicherheit der pH-Elektrode bzw. die Auflösung des Spektrophotometers. Messwerte wurden mit sigmoidaler Boltzmann-Funktion (rot) approximiert. Wendepunkt des Fits (~pK<sub>s</sub>-Wert) durch gestrichelte Linie angedeutet.

Der sigmoidale Verlauf der Titrationskurve (pH gegen λ<sub>max</sub>) wurde durch eine Boltzmann-Funktion mit einem Wendepunkt bei ~ 2,57 angenähert. Der Wendepunkt entspricht dem pK<sub>s</sub>-Wert einer bzw. mehrerer durch das Medium protonierbarer Reste. Als mögliche Reste kommen dabei die sauren Aminosäuren des Gegenionkomplexes, Asp86 und Asp211, in Frage. Da beide Reste bei physiologischem pH höchstwahrscheinlich mehrheitlich deprotoniert vorliegen (pK<sub>s</sub> << pH, vgl. Abs. 3.2.2.1), könnten sie bei Ansäuerung des Mediums

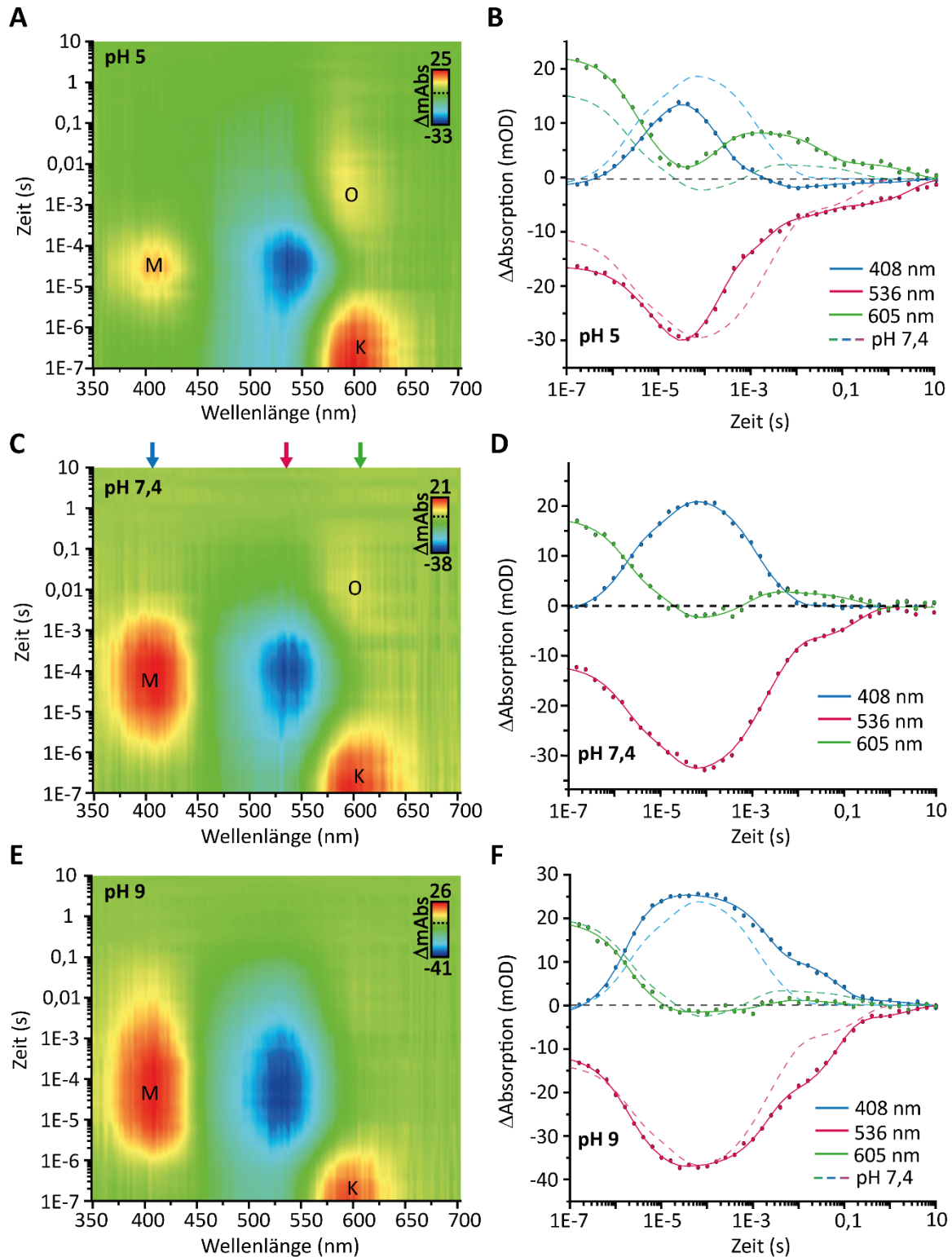
protoniert (hier Neutralisation der anionischen Gegenionen) werden. Die bei der Azidifizierung des Proteins beobachtete Rotverschiebung des Absorptionsspektrums ist mit dieser Annahme konsistent, da durch die Neutralisation der negativen Ladung im Gegenionkomplex, die positive Ladung an der RSBH<sup>+</sup> schlechter stabilisiert werden kann (Destabilisierung des elektronischen Grundzustandes), wodurch es zu einer energetischen Annäherung des elektronischen Grund- und angeregten Niveaus kommt. Der experimentell bestimmte  $pK_s$ -Wert stimmt hierbei mit dem für den primären Protonenakzeptor Asp85 in BR ermittelten Wert von  $\sim 2,6$  (Balashov *et al.*, 1996) überein. Folglich scheint die Zuordnung des analogen Restes in CsR (Asp86), auch auf Grundlage der konservierten Architektur des Gegenion-Komplexes (vgl. Abb. 12A, B) konsequent.

### 3.3.1.3 Zeitaufgelöste Blitzlicht-Photolyse-Messungen an CsR-WT

Zeitaufgelöste Blitzlicht-Photolyse-Messungen an CsR-WT wurden unter sauren (pH 5), neutralen (pH 7,4) und alkalischen (pH 9) Bedingungen durchgeführt. Die daraus entstandenen Konturplots sind in Abbildung 20A, C, und E dargestellt. Dabei konnten drei Photozyklusintermediate eindeutig identifiziert werden, die in Analogie zu BR als K, M und O bezeichnet werden. Der chronologische Ablauf des Photozykluses ist dabei charakteristisch für lichtgetriebene Protonenpumpen vom BR-Typ, der am Beispiel des BR (vgl. Abs. 1.3.1.1) eingeführt wurde.

Interessanterweise konnte das für BR beschriebene L-Intermediat, das innerhalb von 2  $\mu$ s gebildet wird und eine Differenzabsorptionsmaximum bei 550 nm aufweist (Edman *et al.*, 2004), für CsR nicht beobachtet werden. Auch ein auf das M-Intermediat folgendes N, das die Reprotonierung der RSB vor der Reisoomerisierung des Chromophors markiert (vgl. Abs. 1.3.1.1), kann in den Differenzspektren des WT nicht aufgelöst werden. Ein Grund dafür könnte die spektrale Überlagerung mit dem Dunkelzustand sein, welche auch für BR beschrieben wurde (Balashov *et al.*, 1990). Im Zuge der globalen Analyse wurden diese beiden Intermediate dennoch als kinetische Übergangskomponenten von K zu M, beziehungsweise M zu O mitgerechnet. Die aus der globalen Analyse errechneten Evolutions-assoziierten Differenzspektren (EADS, Englisch „*evolutionary associated difference spectra*“) ermöglichen dabei die Zuordnung der Zeitkonstanten zu den jeweiligen Photointermediaten.

Aus den in Abbildung 20A, C und E dargestellten Konturplots wird bereits ersichtlich, dass der Photozyklus, exakter die Bildungs- und Zerfallskinetiken der einzelnen Intermediate, stark pH-abhängig sind.



**Abbildung 20** Konturplots der gemittelten ( $n = 15$ ) spektralen Veränderungen von rekombinantem CsR-WT nach Laserblitz-Anregung für pH 5 (**A**) pH 7,4 (**B**) und pH 9 (**C**). Pufferbedingungen wie in Abbildung 18C beschrieben. D,E,F Darstellung charakteristischer Trajektorien für pH 5 (**D**), pH 7,4 (**E**) und pH 9 (**F**). Zuordnung der Wellenlängen im Konturplot durch Pfeile in B angegeben. Für pH 5 und pH 9 wird der kinetische Verlauf bei pH 7,4 (gestrichelt, normiert auf maximale Änderung bei 536 nm) zum Vergleich mitangeführt.

Unter neutralen Bedingungen zerfällt das rotverschobene K-Intermediat mit  $\tau_{K-pH7,4} \sim 1,8 \mu s$  (Abb. 20C, D). Die Lebensdauer zeigt dabei eine leichte pH-abhängige Varianz

und ist indikativ für die pH-abhängige Entstehung des M-Intermediates. Dabei nimmt die Lebensdauer des K-Intermediates unter sauren Bedingungen zu ( $\tau_{K-pH5} \sim 2,3 \mu s$ , Abb. 20A, B), während es unter alkalischen Bedingungen zu einem beschleunigten ( $\tau_{K-pH9} \sim 1,6 \mu s$ , Abb. 20E, F) Zerfall kommt. Eine stärker ausgeprägte pH-Abhängigkeit, zeigt die zweite kinetische Komponente des K zu M-Überganges auf. Dabei ist der Übergang bei pH 9 ( $\tau_{K/M-pH9} \sim 7 \mu s$ ) fast 2,5-fach gegenüber pH 7,4 ( $\tau_{K/M-pH7,4} \sim 18 \mu s$ ) beschleunigt. Bei BR zeigten Messungen einen vergleichbaren Einfluss des pH-Wertes auf den analogen Photozyklusschritt bereits bei pH 5,8, was zu der entsprechenden Festlegung des  $pK_s$ -Wertes des PRC im M-Intermediat führte (Zimanyi *et al.*, 1992). Die Tatsache, dass diese signifikante Beschleunigung in CsR erst bei hohen pH-Werten auftritt, kann auch auf die verschiedenartige Konfiguration des PRC zurückgeführt werden (siehe Abs. 3.2.2.2). Im Widerspruch zu dem oben aufgeführten Befund, scheint die für pH 5 bestimmte Zeitkonstante dieses Überganges ( $\tau_{K/M-pH5} \sim 11 \mu s$ ) zu stehen. Hierbei muss allerdings die spektrale Überlappung der schnellen Akkumulation des O-Intermediates berücksichtigt werden, der die Auswertung des mit K assoziierten Differenzspektrums beeinflussen kann (Abb. 20B). Die in Abbildung 20B dargestellte Überlagerung der Wellenlängenspur bei 408 nm demonstriert hingegen, dass die Entstehung des M-Intermediates bei pH 5 tatsächlich leicht gegenüber pH 7,4 verlangsamt ist. Durch ein pH-abhängiges Equilibrium zwischen M und N/O ist die Lebensdauer des M-Intermediates selbst ebenfalls stark pH-abhängig. Unter sauren Bedingungen ist das Quasi-Equilibrium zu O verschoben und M zerfällt mit  $\tau_{M-pH5} \sim 190 \mu s$ . Bei pH 7,4 kann der Zerfall des M-Intermediates mit zwei EADS assoziiert werden. Dabei Zerfall durch zwei Zeitkonstanten ( $\tau_{M1-pH7,4} \sim 930 \mu s$  und  $\tau_{M2-pH7,4} \sim 4,4 ms$ ) beschrieben. Auch bei pH 9 zeigt sich eine weitere Zunahme der M Lebensdauer ( $\tau_{M1-pH9} \sim 2 ms$  und  $\tau_{M2-pH9} \sim 7,2 ms$ ). Letztlich zeigt auch die Akkumulation des O-Intermediates eine starke pH-Abhängigkeit. Dabei wird die O-Akkumulation maßgeblich durch zwei Parameter bestimmt. Zum einen der Geschwindigkeit der Reprotonierung der RSB und somit der eben beschriebenen pH-Abhängigkeit der M-Lebensdauer und zum anderen durch den Protonierungsgrad des PRC, der die Deprotonierung von Asp86 beeinflusst. In Abbildung 20A, B ist die verhältnismäßig starke Akkumulation des O-Intermediates bei pH 5 erkennbar, die bis in den Sekundenbereich sichtbar bleibt. Das O-Intermediat zerfällt hierbei mit einer biphasischen Kinetik ( $\tau_{O1-pH5} \sim 35 ms$  und  $\tau_{O2-pH5} \sim 3 s$ ). Auch bei pH 7,4 ist eine Akkumulation des O-Intermediates noch deutlich im Konturplot (Abb. 20C) zu sehen. Der Zerfall des O-Intermediates kann dabei durch eine monophasische Kinetik angenähert werden ( $\tau_{O-pH7,4} \sim 0,2 s$ ). Eine ähnliche Zeitkonstante wurde für den letzten Photozyklusschritt bei AR-1 (pH 7, 400 mM NaCl) bestimmt (Furuse *et al.*, 2015). Allerdings zeigte bei AR-1 das dem Dunkelzustand (DS) vorhergehende Intermediat keine für O charakteristische Verschiebung des

Absorptionsspektrums auf. Eine vergleichbare Beobachtung kann für CsR bei der Messung unter alkalischen Bedingungen (pH 9) gemacht werden (Abb. 20E), bei der eine Akkumulation des O-Intermediates aus dem Konturplot nicht direkt erkennbar ist. Die Trajektorie bei 605 nm zeigt allerdings geringe Absorption im späten Zeitbereich auf (Abb. 20F). Dabei ist ein Ausbleichen des DS noch im späten Sekundenbereich deutlich sichtbar und die Restauration der DS-Absorption erfolgt erst mit  $\tau_{DS'-pH9} \sim 2,8$  s. Aus diesem Befund können zwei mechanistische Hypothesen abgeleitet werden. Zum einen scheint bei pH 9 die Deprotonierung des PRC beschleunigt, was eine schnelle Deprotonierung des Asp86 ermöglicht und zum anderen kann die Reprotonierung des primären Protonendonors Asp96 verlangsamt sein, wodurch es zu einer verlangsamtten Rückkehr in den DS kommt.

Die exakten Ergebnisse der globalen Analyse sind übersichtshalber in Tabelle 9 zusammengefasst.

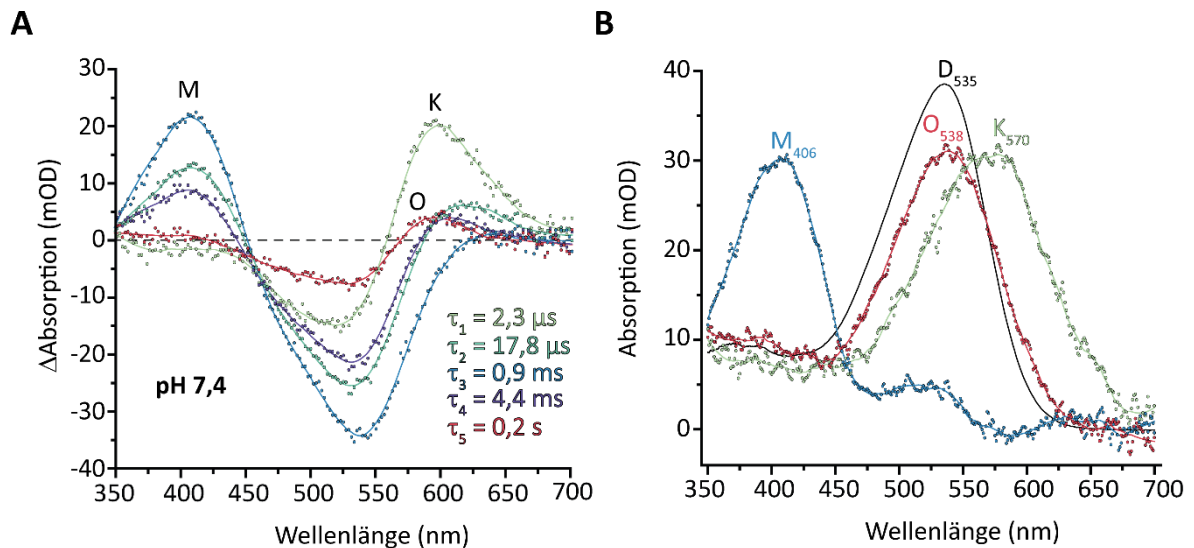
**Tabelle 9** Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-WT bei pH 5, 7,4 und 9, ermittelt aus der globalen Analyse mit 5 - 6 Komponenten. Assoziierte Photozyklusintermediate mitaufgeführt.

<b>CsR-WT</b>	<b>pH 5 (s)</b>	<b>pH 7,4 (s)</b>	<b>pH 9 (s)</b>
$\tau_1$ Assoz. Intermediat	$2,28 \cdot 10^{-6} \pm 5,99 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>	$1,75 \cdot 10^{-6} \pm 2,83 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>	$1,55 \cdot 10^{-6} \pm 2,39 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>
$\tau_2$ Assoz. Intermediat	$1,11 \cdot 10^{-5} \pm 3,18 \cdot 10^{-7}$ K/M	$1,78 \cdot 10^{-5} \pm 4,16 \cdot 10^{-7}$ K/M	$6,99 \cdot 10^{-6} \pm 1,96 \cdot 10^{-7}$ <b>M</b>
$\tau_3$ Assoz. Intermediat	$1,91 \cdot 10^{-4} \pm 3,24 \cdot 10^{-6}$ <b>M</b>	$9,27 \cdot 10^{-4} \pm 2,85 \cdot 10^{-5}$ <b>M</b>	$2,00 \cdot 10^{-3} \pm 1,81 \cdot 10^{-5}$ <b>M</b>
$\tau_4$ Assoz. Intermediat	$1,99 \cdot 10^{-3} \pm 6,45 \cdot 10^{-5}$ <b>O</b>	$4,41 \cdot 10^{-3} \pm 1,03 \cdot 10^{-4}$ M/O	$7,16 \cdot 10^{-3} \pm 7,59 \cdot 10^{-4}$ <b>M</b>
$\tau_5$ Assoz. Intermediat	$3,46 \cdot 10^{-2} \pm 9,43 \cdot 10^{-4}$ <b>O</b>	$2,33 \cdot 10^{-1} \pm 5,19 \cdot 10^{-3}$ <b>O</b>	$2,83 \pm 0,11$ <b>DS'</b>
$\tau_6$ Assoz. Intermediat	$3,06 \pm 6,16 \cdot 10^{-2}$ <b>O</b>		

Da für die globale Analyse der oben beschriebenen Daten ein sequentielles Modell angenommen wurde, stimmen die errechneten EADS mit den echten Intermediats-assoziierten Differenzspektren überein (SADS, Englisch „*species associated difference spectra*“; Van Stokkum, Larsen and Van Grondelle, 2004). Damit lassen sich mithilfe der EADS (Abb. 21A)



und des Dunkelspektrums (Abb. 18A), die in Abbildung 21B dargestellten Absolutspektren der einzelnen Intermediate berechnen.



**Abbildung 21** **A** Berechnete EADS von CsR bei pH 7,4. Maximale positive Absorptionsänderung (Licht – Dunkel) der berechneten Photointermediate mit dem jeweiligen Buchstaben gekennzeichnet. SVD-rekonstruierte Daten (Punkte) und geglättete Kurven (Linien) zur besseren Visualisierung, sind gezeigt. **B** Berechnete Absolutspektren der Photointermediate K (grün), M (blau) und O (rot). Das der Berechnung zugrunde liegende Dunkelspektrum (angenommene Anregung 10 %, aller Moleküle) ist in schwarz dargestellt. Wellenlänge der maximalen Absorption für die einzelnen Intermediate angegeben.

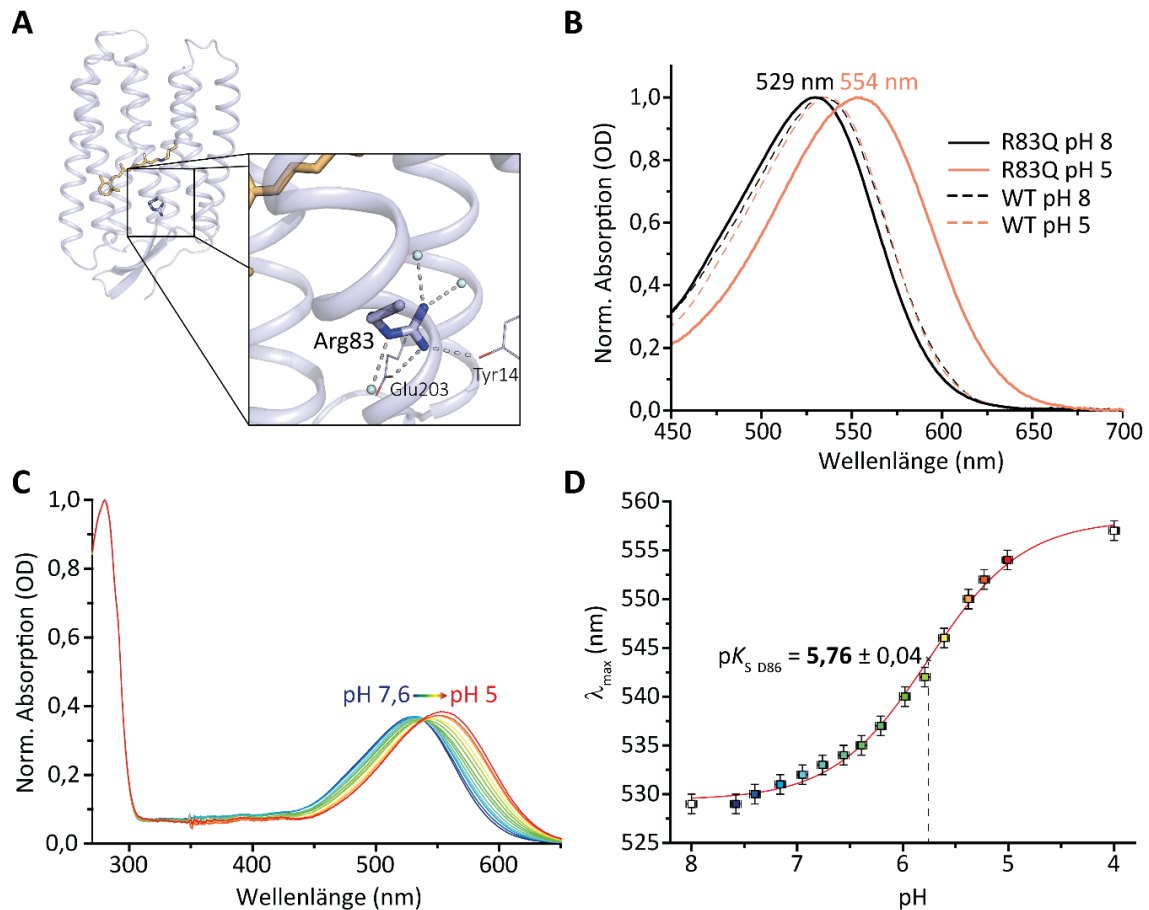
Die Absolutspektren der K-, M und O-Intermediate zeigen anschaulich die spektralen Eigenschaften der einzelnen Intermediate auf. Dabei ist K das am deutlichsten bathochrom verschobene Intermediat und zeigt eine spektrale Verbreiterung mit einer maximalen Absorption bei 570 nm. In BR wurde die Rotverschiebung des K-Intermediates auf eine veränderte Geometrie der RSBH<sup>+</sup>-Gegenion-Wechselwirkung zurückgeführt, welche durch die *trans-cis*-Isomerisierung der C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Doppelbindung der prosthetischen Gruppe bedingt ist (Schobert *et al.*, 2002). Die Annahme einer zu BR analogen Konfiguration des K-Intermediates in CsR liegt aufgrund der Homologie des Gegenionkomplexes (vgl. Abs. 3.2.2.1) nahe. Das aus der Deprotonierung der Schiff'schen Base hervorgehende M-Intermediat absorbiert maximal bei 406 nm. Es zeigt gegenüber den anderen Intermediatsspektren die geringste spektrale Überlappung mit dem Dunkelzustand und ist dadurch eindeutiger zu charakterisieren. Das späte rotverschobene O-Intermediat ist nur leicht bathochrom gegenüber dem Dunkelzustand zu 538 nm verschoben. Die im Konturplot beobachtete Rotverschiebung resultiert aus der bathochromen Schulter, die bei 605 nm den größten Unterschied zur Dunkelzustandsabsorption aufzeigt. Der Vergleich der Intermediatsspektren erlaubt Rückschlüsse auf die Konfiguration einzelner Photointermediate, die im Laufe dieser Arbeit zur Charakterisierung verschiedener CsR-Mutanten verwendet werden.

Untersuchungen an BR zeigten, dass außer dem pH sowohl Ionenstärke, Temperatur und auch die Lipidkomposition einen Einfluss auf die Dynamik des Photozyklus haben (Corcoran, Dupuis and El-Sayed, 1986; Váró and Lanyi, 1991; Ludmann, Gergely and Váró, 1998; T. Y. Lee *et al.*, 2015). Entsprechend können die für CsR bestimmten Zeitkonstanten nur generalisiert evaluiert werden. Es soll hierbei allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass die späten Photozyklusschritte, namentlich der Übergang von N/O in den Dunkelzustand mit >200 ms im Vergleich zu BR (~30 ms, Heberle *et al.*, 2000) deutlich langsamer erfolgt. Ein vergleichbar langsamer Photozyklus konnte wie oben bereits erwähnt bei AR-1 beobachtet werden.

#### 3.3.2 CsR-Arg83Gln

Das konservierte Arg83 (vgl. Abb. 3B, Abb. 6) ist essentiell für den Erhalt der Pumpleistung in CsR. Wie bereits erwähnt, veranschaulichten elektrophysiologische Untersuchungen an CsR, dass eine Mutation zu dem kleineren neutralen Glutamin die Pumpe teilweise undicht machen, wodurch es zu passiven Protonenströmen kam (Vogt *et al.*, 2015). Um die mechanistischen Implikationen dieser so genannten „Leck“-Mutation des CsR zu eruieren und so mögliche Rückschlüsse auf aktive und passive Protonentransferprozesse zu erlauben, wurde CsR-Arg83Gln weitergehend spektroskopisch untersucht.

Die Substitution von Arg83 zu Glutamin führt zu einer Blauverschiebung des Absorptionsmaximums gegenüber dem WT um 6 nm zu 529 nm (Abb. 22B) was auch in elektrophysiologischen Aktionsspektren aus Messungen an Oozyten beschrieben wurde (Vogt *et al.*, 2015). Im Gegensatz zum WT zeigt CsR-Arg83Gln in saurem pH-Milieu eine starke bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 25 nm zu 554 nm auf (Abb. 22B). Diese Farbverschiebung ist wiederum indikativ für eine pH-induzierte Protonierungsreaktion innerhalb des Gegenionkomplexes. Die in Abbildung 22A dargestellte Konfiguration von Arg83 verdeutlicht dabei, dass die positive Guanidingruppe an zahlreichen H-Brückenbindungen beteiligt ist und unter anderem die mit dem Gegenionkomplex assoziierten Wasser (siehe Abs. 3.2.2.1) stabilisiert. Entsprechend kann eine indirekte, über Wasser mediierte Kopplung von Arg83 mit dem Gegenionkomplex angenommen werden. Eine Substitution des Arg83 zu Glutamin führt, in Analogie zu der pH-Titration am WT (vgl. Abs. 3.3.1.2), offensichtlich zu einer Erhöhung des  $pK_s$ -Wertes des Asp86, welches dadurch bei pH 5 bereits protoniert vorliegt. Interessanterweise wurde eine solche Erhöhung des  $pK_s$ -Wertes des Gegenions durch elektrophysiologischen Messungen ausgeschlossen, da das Aktionsspektrum der Mutante keine spektrale Verschiebung unter sauren Bedingungen zeigte (Vogt *et al.*, 2015).



**Abbildung 22** **A** CsR-Monomer. Vergrößerungsprojektion des ausgewählten Bereiches schwarz umrandet. Guanidingruppe formt H-Brückenbindungen (gestrichelt) zu Tyr13, Glu203 und drei Wassermolekülen (cyan). **B** Normierte UV-vis-Dunkelspektren der Chromophorabsorption von rekombinantem CsR-Arg83Gln (durchgezogen) und CsR WT (gestrichelte) bei pH 8 (schwarz) und pH 5 (orange). **C** pH-Titration (pH 7,6 → pH 4) von CsR-Arg83Gln in 20 mM Tris (pH > 6) / 20 mM MES (pH ≤ 6), 150 mM NaCl, 0,03% DDM. **D** Titrationskurve (pH vs.  $\lambda_{\max}$ ) von CsR-Arg83Gln. Daten aus C. Messwert bei pH 4 und 8 aus Referenzmessungen (pH 4 nicht gezeigt, pH 8 aus B). Fehlerbalken zeigen Messunsicherheit der pH-Elektrode bzw. Auflösung des Spektrophotometers. Messwerte wurden mit sigmoidaler Boltzmann-Funktion (rot) approximiert. Wendepunkt des Fits ( $\sim pK_s$ ) durch gestrichelte Linie angedeutet.

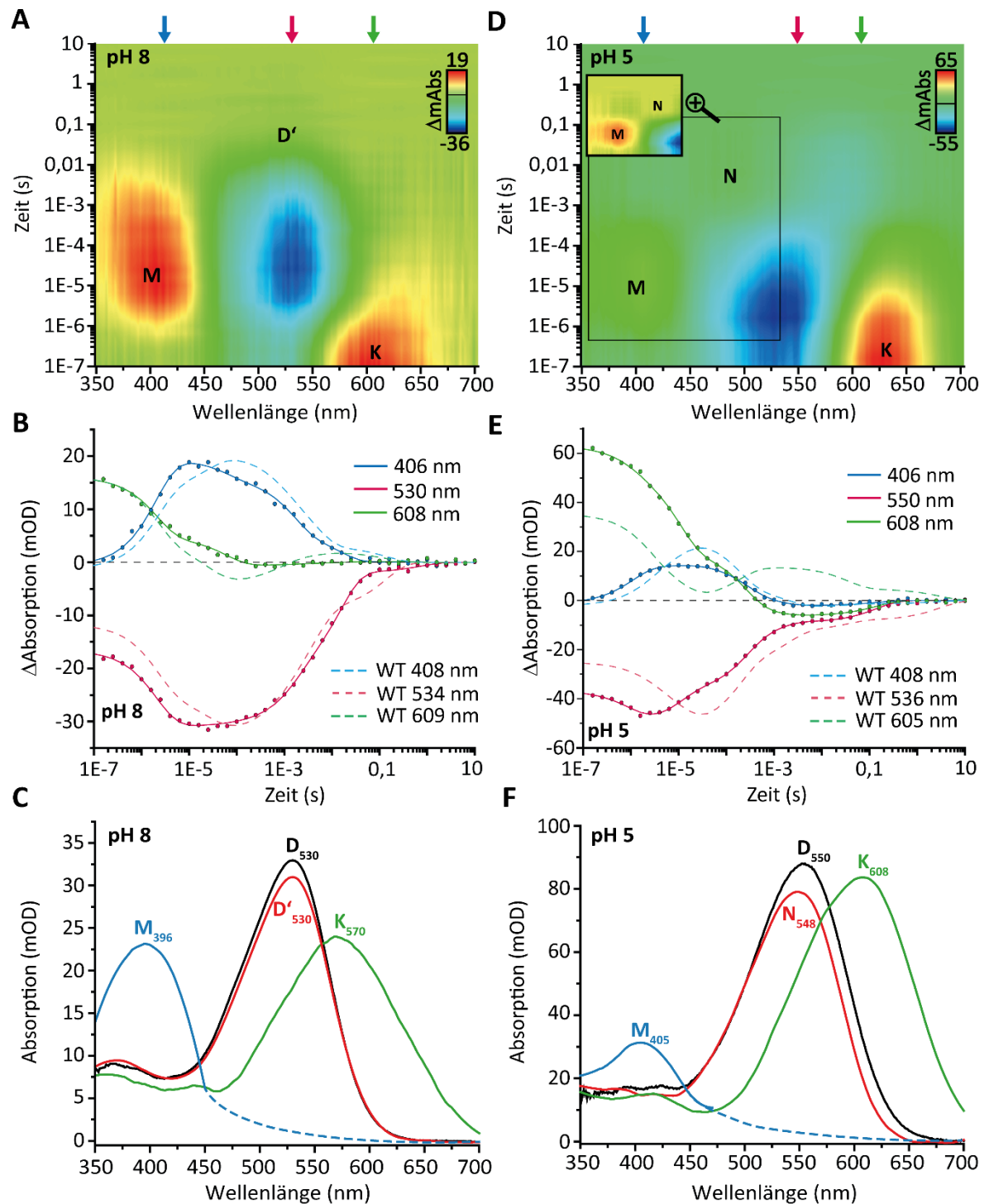
Die in Abbildung 22C dargestellte sukzessive Verschiebung des Absorptionsmaximums von 529 zu 554 nm bei abnehmenden pH lässt sich durch eine Titrationsreihe quantifizieren. Der sigmoidale Verlauf der in Abbildung 22D dargestellten pH-Titrationsreihe lässt sich dabei durch einen sigmoidalen Boltzmann-Fit annähern. Daraus konnte der  $pK_s$ -Wert des primären Protonakzeptors Asp86 in CsR-Arg83Gln mit  $\sim 5,76$  bestimmt werden. Demnach kommt es innerhalb der Mutante im Vergleich zum WT zu einer Erhöhung des  $pK_s$ -Wertes von Asp86 um  $\sim 3$  pH-Einheiten. In BR erhöhte die Substitution des Arg82 zu Glutamin den  $pK_s$ -Wert des analogen Asp85 sogar auf 7,2, was einer Erhöhung um  $\sim 4,5$  pH-Einheiten entspricht (Brown *et al.*, 1993). Da der Gegenionkomplex des CsR quasi identisch zu BR aufgebaut ist, kann die in CsR beobachtete geringere Erhöhung des  $pK_s$ -Wertes vorrangig auf die Kopplung mit dem verschiedenartigen PRC zurückgeführt werden.

Zeitaufgelöste Messungen an CsR-Arg83Gln bei pH 8 und pH 5 sind in Abbildung 23

dargestellt. Bei pH 8 konnte mithilfe der globalen Analyse für das K-Intermediat eine Lebensdauer  $\tau_K \sim 2,1 \mu\text{s}$  (Abb. 23A, B, C) bestimmt werden. Diese Zeitkonstante repräsentiert ebenfalls die monophasische Entstehung des M-Intermediates in CsR-Arg83Gln, welche im WT mit  $\tau_{\text{WT-pH8-K/M}} \sim 10 \mu\text{s}$  etwa fünffach langsamer abläuft (Abb. 23B). Diese beschleunigte Entstehung des M-Intermediates weist auf ein verändertes Reaktionsschema in den frühen Photozyklusschritten hin. Ähnliche Irregularitäten der frühen Photozyklusschritte, wie etwa ein beschleunigter Übergang von L zu M, wurden auch für die BR-Mutante Arg82Gln beschrieben (Otto *et al.*, 1990; Garczarek *et al.*, 2005). Der Zerfall des M-Intermediates kann durch zwei apparente Zeitkonstanten ( $\tau_{1M} \sim 1,6 \text{ ms}$  und  $\tau_{2M} \sim 15 \text{ ms}$ ) beschrieben werden. Die scheinbare Blauverschiebung der M-Intermediatsabsorption im mittleren Zeitregime des Photozykluses kann auf eine spektrale Überlagerung mit der Entstehung eines rotverschobenen Intermediates hindeuten, die auch durch das asymmetrische Ausbleichen der Dunkelzustandsabsorption in diesem Zeitbereich impliziert wird. Das berechnete Absolutspektrum des M-Intermediates zeigt dabei maximale Absorption bei 396 nm und ist damit um 10 nm hypsochrom gegenüber dem WT M-Intermediat verschoben (Abb. 23C, vgl. Abb. 21B). Das O-Intermediat ist in den Differenzspektren nicht zu beobachten. Die triphasische Rückkehrkinetik des Dunkelzustandes (Abb. 23B) lässt darauf schließen, dass ein O-ähnliches, in seinen spektroskopischen Eigenschaften dem Dunkelzustand gleichendes Intermediat in einem späten Zeitbereich entsteht, das entsprechend D' genannt wurde. D' muss dabei einen geringeren molaren Extinktionskoeffizienten als der Dunkelzustand aufweisen und geht mit  $\tau_{D'} \sim 0,8 \text{ s}$  in den Dunkelzustand über. Das für D' berechnete Absolutspektrum ist in Abbildung 23C dargestellt. Auch BR-Arg82Gln zeigt eine nur geringe Akkumulation an O-Intermediat, was dadurch erklärt wurde, dass die positive Ladung der Arg82 Seitenkette eine Bedingung für die schnelle Reisoomerisierung von 13-*cis* zu all-*trans*-Retinal während des N-zu-O-Überganges darstellt (Brown *et al.*, 1995).

CsR-Arg83Gln zeigt bei pH 5 eine, gemessen an den Intensitäten, gegenüber dem WT zweifach erhöhte Akkumulation des bathochrom verschobenen K-Intermediates, das bis in den hohen Mikrosekundenbereich sichtbar bleibt (Abb. 23D, E, F). Vor dem Hintergrund eines protonierten Asp86 ist diese Beobachtung durchaus nachvollziehbar, da ein neutrales Asp86 nicht mehr als Protonakzeptor der RSBH<sup>+</sup> fungieren kann. Entsprechend gering ist auch die Akkumulation des M-Intermediates. Das Amplitudenverhältnis von K zu M beträgt dabei circa 3:1 (Abb. 23, F). Die Entstehung des M-Intermediates ist wie bei pH 8 monophasisch und gegenüber dem WT beschleunigt ( $\tau_{K\text{-pH5}} \sim 1,1 \mu\text{s}$ ,  $\tau_{K\text{-WT-pH5}} \sim 2 \mu\text{s}$  /  $\tau_{K/M\text{-WT-pH5}} \sim 11 \mu\text{s}$ , vgl. Tab. 1). Der Zerfall des M-Intermediates ist mit  $\tau_{M\text{-pH5}} \sim 0,25 \text{ ms}$  hingegen mit der Zerfallskinetik des WT vergleichbar (Abb. 23E,  $\tau_{M\text{-pH5}} \sim 0,2 \text{ ms}$ , vgl. Tab. 1). Es ist folglich nicht auszuschließen, dass in der Mutante nur ein Teil aller angeregten Proteine den Photozyklus durchläuft,

während der andere Teil ohne eine Deprotonierung der RSB thermisch reisomerisiert.



**Abbildung 23** Konturplots der gemittelten ( $n = 15$ ) spektralen Veränderungen von rekombinantem CsR-Arg83Gln nach Laserblitz-Anregung für pH 8  $A_{529} \sim 0,3$  (A) und pH 5  $A_{550} \sim 0,8$  (D). Für bessere Visualisierung von M und N wurde die Farbskalierung entsprechend modifiziert (eingrahmt). Vergleich der zeitlichen Verläufe dreier charakteristischer Transienten (Pfeile in A, D) zwischen Arg83Gln (durchgezogen) und WT (gestrichelt, normiert auf maximale Absorptionsänderung von Arg83Gln bei 530 nm (B) bzw. 550 nm (E)) bei pH 8 (B) und pH 5 (E). Berechnete Absorptionsspektren der Photointermediate mit ihren jeweiligen Absorptionsmaxima bei pH 8 (C) und pH 5 (F). Das der Berechnung zugrunde liegende Dunkelspektrum (angenommene Anregung 10 %, aller Moleküle) ist in schwarz dargestellt. Wellenlänge der maximalen Absorption für die einzelnen Intermediate angegeben. Erwartetes M-spektrum  $>450$  nm ist skizziert (gestrichelt).

Interessanterweise kann auch bei pH 5 keine Akkumulation des rotverschobenen O-Intermediates beobachtet werden (Abb. 23D), was in deutlicher Diskrepanz zum WT steht. Stattdessen wird ein spätes blauverschobenes Intermediat sichtbar, welches als N bezeichnet wurde und ein berechnetes Absorptionsmaximum von 548 nm aufweist (Abb. 23D, F). Dieses N-Intermediat unterscheidet sich dabei deutlicher als das für pH 8 beschriebene D' vom Dunkelzustand, was sowohl auf die verringerte Akkumulation an M-Intermediat, als auch auf die bathochrome Verschiebung des Dunkelzustandes zurückzuführen ist, die zu einer geringeren spektralen Überlappung der Intermediate führt. Das blauverschobene N-Intermediat könnte in Analogie zu BR als potentielle 13-*cis*-Spezies klassifiziert werden (Hofrichter, Henry and Lozier, 1989; Scherrer *et al.*, 1989) und geht mit  $\tau_N \sim 0,14$  s in den Dunkelzustand über. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass auch in CsR durch die fehlende positive Guanidingruppe von Arg82 die Reiserisierung des Retinals verlangsamt wird. Dadurch kann es zu einer Deprotonierung des primären Protonakzeptors Asp86 kommen noch bevor das Retinal in die all-*trans*-Dunkelzustandskonfiguration reiserisiert. Zu welchem Zeitpunkt des Photozykluses diese Deprotonierung auftritt und in wie weit der Mechanismus dieser Deprotonierung gegenüber dem WT verändert ist, lässt sich mit der gegenwärtigen Datenlage nicht beantworten. Die exakten, durch die globale Analyse bestimmten Zeitkonstanten sind in Tabelle 10 vermerkt.

**Tabelle 10** Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-Arg83Gln bei pH 5 und pH 8, ermittelt aus der globalen Analyse mit 5 Komponenten. Assoziierte Photozyklusintermediate mitaufgeführt

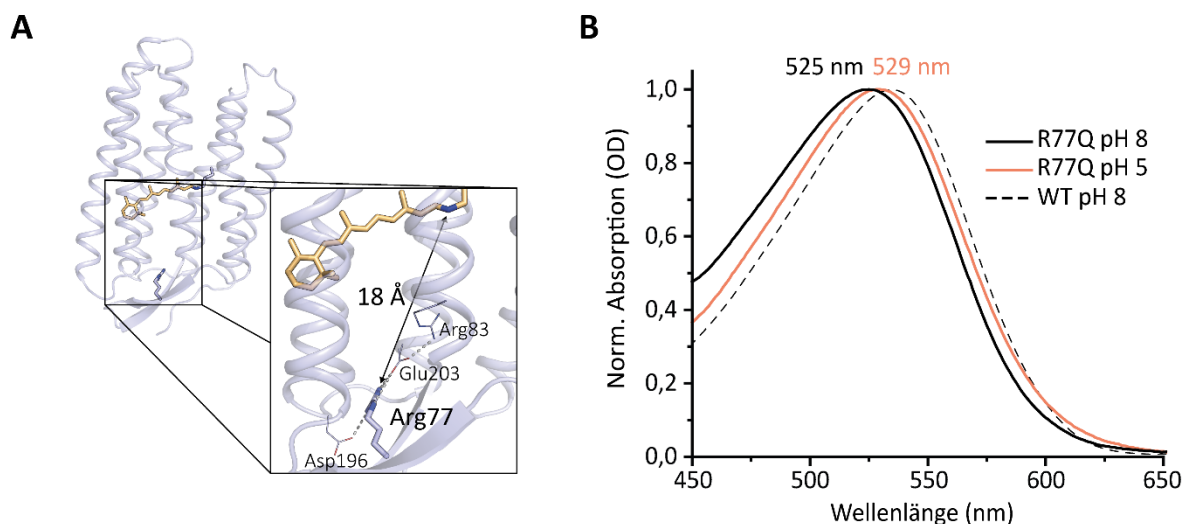
<b>CsR-Arg83Gln</b>	<b>pH 5 (s)</b>	<b>pH 8 (s)</b>
$\tau_1$ Assoz. Intermediat	$1,08 \cdot 10^{-6} \pm 5,56 \cdot 10^{-9}$ <b>K</b>	$2,11 \cdot 10^{-6} \pm 1,08 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>
$\tau_2$ Assoz. Intermediat	$1,05 \cdot 10^{-5} \pm 8,21 \cdot 10^{-8}$ <b>K/M</b>	$6,08 \cdot 10^{-5} \pm 1,19 \cdot 10^{-6}$ <b>K/M</b>
$\tau_3$ Assoz. Intermediat	$2,51 \cdot 10^{-4} \pm 3,05 \cdot 10^{-6}$ <b>K/M</b>	$1,58 \cdot 10^{-3} \pm 2,52 \cdot 10^{-5}$ <b>M</b>
$\tau_4$ Assoz. Intermediat	$1,10 \cdot 10^{-3} \pm 3,72 \cdot 10^{-5}$ <b>N</b>	$1,52 \cdot 10^{-2} \pm 1,54 \cdot 10^{-4}$ <b>M</b>
$\tau_5$ Assoz. Intermediat	$1,43 \cdot 10^{-2} \pm 1,19 \cdot 10^{-3}$ <b>DS'</b>	$7,63 \cdot 10^{-1} \pm 3,57 \cdot 10^{-2}$ <b>DS'</b>

Zusammenfassend verdeutlichen die Messungen an CsR-Arg83Gln deutliche

funktionale Unterschiede der Photochemie zum WT. So konnte gezeigt werden, dass die Substitution des Arg83 durch das kleinere neutrale Glutamin nicht nur die stationäre Konfiguration des Proteins verändert, sondern auch einen Einfluss auf die Dynamik des Photozykluses nimmt. Dabei sind die Übergänge der frühen Photozyklusintermediate gegenüber dem WT beschleunigt, während im späteren Verlauf des Photozykluses eine verlangsamte Reisomerisierung des Chromophores beobachtet werden kann.

### 3.3.3 CsR-Arg77Gln

Der PRC von CsR (vgl. Abs. 3.2.2.1) beinhaltet neben dem in BR beobachteten Glu194/204-Paar ein sich im  $\beta$ -Faltblatt befindliches Arginin an Position 77 (Abb. 24A), welches in Wechselwirkung mit Glu203 (Glu204 in BR) tritt. Diese Arg/Glu-Wechselwirkung konnte ebenfalls in AR-1 und -2 beobachtet werden (vgl. Abb. 14B). Da es allerdings weder zu AR-1 noch zu AR-2 Mutagenesestudien gibt, wurde diese Wechselwirkung nicht näher charakterisiert. Entsprechend soll hier der Einfluss von Arg77 auf den Photozyklus von CsR untersucht werden, um weitere mechanistische Schlussfolgerungen zur Protonenfreisetzung zu erlauben.



**Abbildung 24** **A** CsR-Monomer. Vergrößerungsprojektion des ausgewählten Bereiches schwarz umrandet. Darstellung von Arg77 im extrazellulären  $\beta$ -Faltblatt. H-Brückenbindungen zwischen den Resten (graue Striche) und Abstand zur RSB mitaufgeführt. **B** Normierte UV-vis-Dunkelspektren der Chromophorabsorption von rekombinantem CsR-Arg77Gln (durchgezogen) und CsR WT (gestrichelte) bei pH 8 (schwarz) und pH 5 (orange). Die angegebenen Wellenlängen repräsentieren das Absorptionsmaximum der Mutante beim jeweiligen pH-Wert.

Arg77 sitzt im Abstand von 18Å zur RSB an der extrazellulären Oberfläche des Proteins (Abb. 24A). Dort bildet es H-Brückenbindungen mit den Seitenketten des Asp196 im

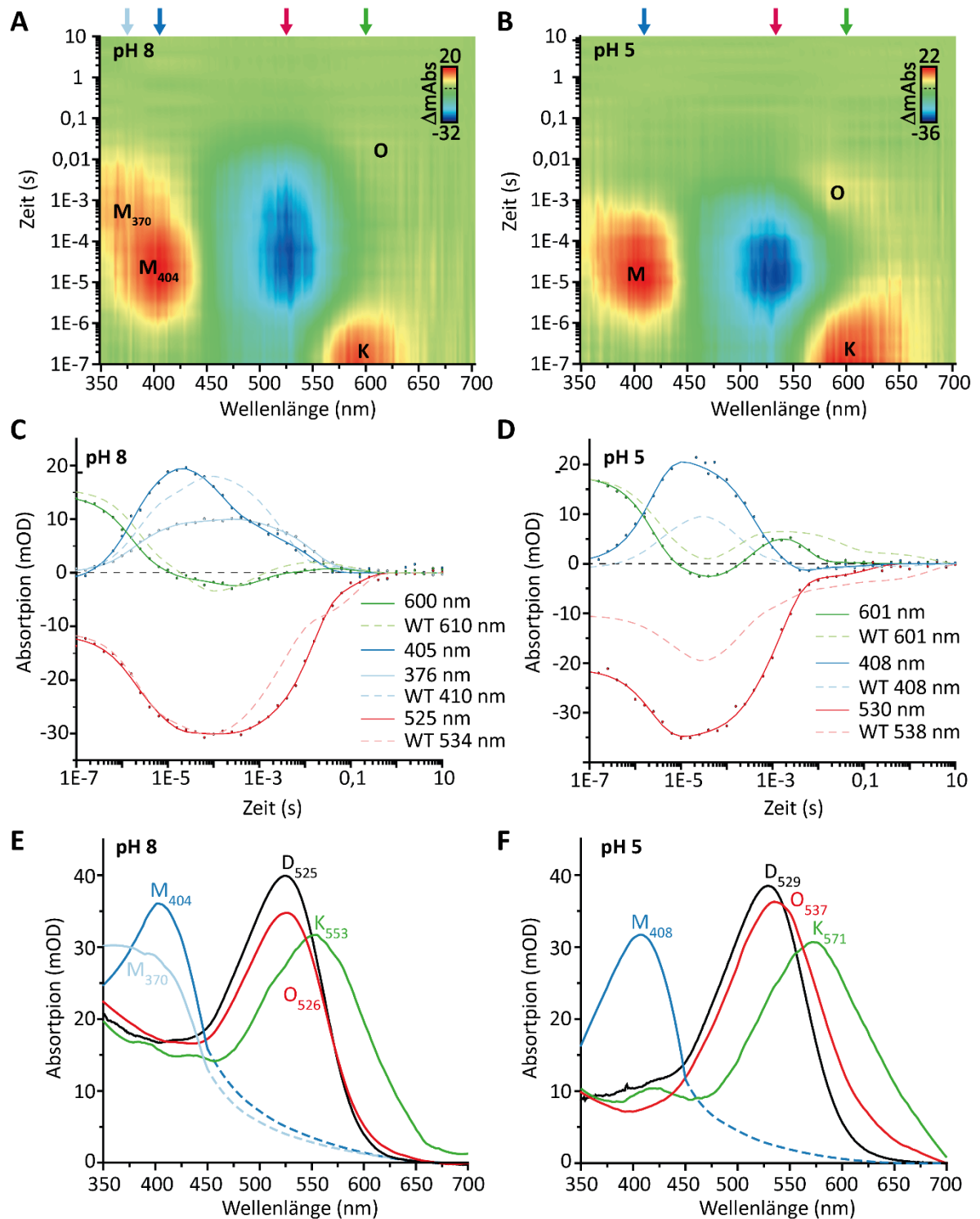
interhelikalen Loop zwischen Helix 6 & 7 und Glu203 in Helix 7, sowie zum Rückgratsauerstoff des sich ebenfalls im Loop zwischen Helix 6 & 7 befindlichen Ile198 (nicht gezeigt) aus. Da sowohl das zweite Gegenion Asp211 als auch Lys215 sich in Helix 7 befinden, trägt Arg77 durch die Fixierung dieser Helix möglicherweise zur Stabilisation des Gegenionkomplexes bei. Die Auswirkungen der Substitution des Arg77 zu Glutamin machen sich tatsächlich schon in der Dunkelzustandsabsorption bemerkbar. CsR-Arg77Gln zeigt eine maximale Dunkelzustandsabsorption bei  $\lambda_{\text{max}}=525$  nm und ist somit um 10 nm hypsochrom gegenüber dem WT ( $\lambda_{\text{maxWT-pH8}} = 535$  nm, Abb. 24B) verschoben. Bei pH 5 ist nur eine leichte bathochrome Verschiebung um 4 nm zu  $\lambda_{\text{max}}=529$  nm (Abb. 24B) festzustellen.

Zeitaufgelöste Blitzlicht-Photolyse-Messungen an CsR-Arg77Gln bei pH 8 und pH 5 demonstrieren einen starken Einfluss dieser Mutation auf den Photozyklus. Bei pH 8 war eine gegenüber dem WT beschleunigte Deprotonierung der RSBH<sup>+</sup> zu erkennen (Abb. 25A,C), die durch eine verkürzte Lebensdauer des K-Intermediates ( $\tau_{\text{K-pH8}} \sim 1,3$   $\mu\text{s}$ ,  $\tau_{\text{K-WT-pH8}} \sim 2$   $\mu\text{s}$ ) repräsentiert wird. Weiterhin ist das maximale Differenzsignal im M-Intermediat, welches im WT nach ca. 100  $\mu\text{s}$  erreicht wird, bereits nach ca. 11  $\mu\text{s}$  zu detektieren (Abb. 25C). Dementsprechend ist es möglich, dass es bei CsR-Arg77Gln zu einer räumlichen Annäherung des Gegenions Asp86 und der RSB kommt. Eine verstärkte Kopplung der beiden Reste könnte die hypsochrome Verschiebung der Dunkelzustandsabsorption und eine schnellere Deprotonierung der RSBH<sup>+</sup> erklären. Im weiteren kinetischen Verlauf ( $t > 300$   $\mu\text{s}$ ) kommt es zu einer hypsochromen Verschiebung des M-Differenzspektrums (Abb. 25A). Diese ungewöhnliche Verschiebung des M-Intermediates konnte in der globalen Analyse nur durch zwei unabhängige kinetische Komponenten angenähert werden. Daraus resultierte eine zeitliche Auftrennung des M-Intermediates in zwei Subpopulationen, die entsprechend ihrer Absorptionseigenschaften M<sub>404</sub> und M<sub>370</sub> genannt werden (Abb. 25C, E). Während bei M<sub>404</sub> eine gegenüber dem WT beschleunigte Zerfallskinetik festgestellt wurde ( $\tau_{\text{M404}} \sim 137$   $\mu\text{s}$ ), zerfällt M<sub>370</sub> deutlich langsamer ( $\tau_{\text{M370}} \sim 14$  ms) als das im WT beobachtete M-Intermediat (Abb. 25C), was aufgrund der sequentiellen Abfolge beider Intermediate darauf schließen lässt, dass M<sub>370</sub> aus M<sub>404</sub> hervorgeht. Auch das O-Intermediat ( $\tau_0 \sim 113$  ms) ist gegenüber dem WT schwächer ausgeprägt (Abb. 25C). Die Kinetik der Rückkehr in den initialen Dunkelzustand und damit die Gesamtdauer des Photozykluses ist hingegen bei CsR-Arg77Gln und dem WT annähernd gleich (Abb. 25C).

Bei pH 5 ist das K-Intermediat in den Differenzspektren stärker ausgeprägt und weist eine größere Halbwertsbreite auf. Zusätzlich ist die Lebensdauer des frühen Intermediates unter sauren Bedingungen nahezu verdoppelt ( $\tau_{\text{K}} \sim 2,4$   $\mu\text{s}$ , Abb. 25D, F). Das berechnete K-Absolutspektrum weist bei pH 5 eine starke bathochrome Verschiebung ( $\lambda_{\text{max}} = 571$  nm)



gegenüber pH 8 auf (Abb. 25F).



**Abbildung 25** Konturplots der gemittelten ( $n = 15$ ) spektralen Veränderungen von rekombinantem CsR-Arg77Gln nach Laserblitz-Anregung für pH 8 (A) und pH 5 (D). Vergleich der zeitlichen Verläufe vierer bzw. dreier charakteristischer Transienten (Pfeile in A, B) zwischen Arg77Gln (durchgezogen) und WT (gestrichelt, normiert auf maximale Absorptionsänderung von Arg77Gln bei 530 nm (C) bzw. 601 nm (D)) bei pH 8 (C) und pH 5 (D). Berechnete Absorptionsspektren der Photointermediate mit ihren jeweiligen Absorptionsmaxima bei pH 8 (E) und pH 5 (F). Das der Berechnung zugrunde liegende Dunkelspektrum (angenommene Anregung 10 %, aller Moleküle) ist in schwarz dargestellt. Wellenlänge der maximalen Absorption für die einzelnen Intermediate angegeben. Erwartetes M-spektrum  $>450$  nm ist skizziert (gestrichelt).

Während eine verstärkte Akkumulation des K-Intermediates bei pH 5 bereits beim WT beobachtet werden kann, zeigt CsR-Arg77Gln anders als der WT und alle anderen untersuchten Mutanten bei pH 5 ebenfalls eine starke Anreicherung des M-Intermediates (Abb. 25 B, D, F), was für eine veränderte Kopplung von PRC und Gegenionkomplex spricht. Der Zerfall des M-Intermediates kann dabei mit zwei apparenten Zeitkonstanten ( $\tau_{M1} \sim 301 \mu\text{s}$  und  $\tau_{M2} \sim 1,7 \text{ ms}$ ) angepasst werden und ist somit gegenüber pH 8 beschleunigt. Eine spektrale Aufspaltung wie bei pH 8 ist nicht zu beobachten. Die unter sauren Bedingungen beschleunigte Reprotonierung zeigt sich ebenfalls in einer erhöhten Differenzsignalintensität des O-Intermediates (Abb. 25B). Allerdings ist die Akkumulation des O-Intermediates bei pH 5 im Vergleich zum WT gering. Das O-Intermediat zerfällt dabei mit  $\tau_0 \sim 4 \text{ ms}$ . Der initiale Dunkelzustand wird nach  $\sim 300 \text{ ms}$  wieder vollständig regeneriert, was einer Beschleunigung gegenüber dem WT um eine Größenordnung entspricht (Abb. 25D).

Die zeitaufgelösten Blitzlicht-Fotolyse-Messungen verdeutlichen durch die verstärkte Akkumulation des M-Intermediates bei pH 5 und die entsprechend geringe Akkumulation des späten O-Intermediates, dass Arg77 in der Kopplung zwischen PRC und Gegenionkomplex involviert ist. Ähnliche Kopplungseffekte bei BR wurden zwischen der Protonfreisetzungsguppe BR-Glu194/204 und dem Gegenionkomplex bereits mehrfach diskutiert (Balashov, 2000). Die exakten, durch die globale Analyse bestimmten Zeitkonstanten sind in Tabelle 11 vermerkt.

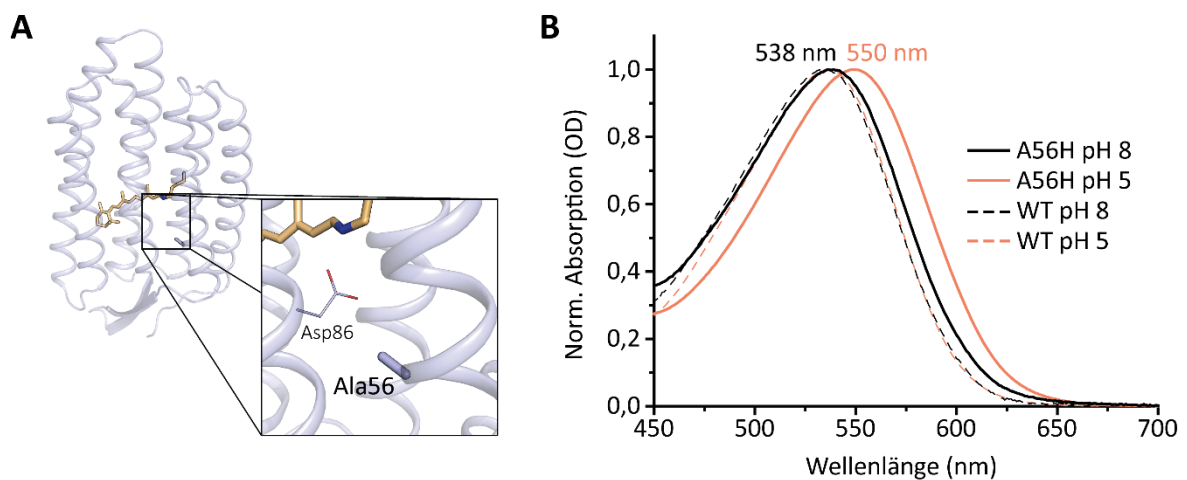
**Tabelle 11** Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-Arg77Gln bei pH 5 und pH 8, ermittelt aus der globalen Analyse mit 5 Komponenten. Assoziierte Photozyklusintermediate mitaufgeführt.

<b>CsR-Arg77Gln</b>	<b>pH 5 (s)</b>	<b>pH 8 (s)</b>
$\tau_1$ Assoz. Intermediat	$2,38 \cdot 10^{-6} \pm 1,29 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>	$1,33 \cdot 10^{-6} \pm 2,73 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>
$\tau_2$ Assoz. Intermediat	$1,58 \cdot 10^{-5} \pm 5,25 \cdot 10^{-7}$ <b>K/M</b>	$6,09 \cdot 10^{-6} \pm 1,95 \cdot 10^{-7}$ <b>K/M<sub>404</sub></b>
$\tau_3$ Assoz. Intermediat	$3,01 \cdot 10^{-4} \pm 8,44 \cdot 10^{-6}$ <b>M</b>	$1,37 \cdot 10^{-4} \pm 3,91 \cdot 10^{-6}$ <b>M<sub>404</sub></b>
$\tau_4$ Assoz. Intermediat	$1,67 \cdot 10^{-3} \pm 4,90 \cdot 10^{-5}$ <b>M/O</b>	$9,12 \cdot 10^{-4} \pm 3,60 \cdot 10^{-5}$ <b>M<sub>370</sub></b>
$\tau_5$ Assoz. Intermediat	$3,95 \cdot 10^{-2} \pm 1,66 \cdot 10^{-4}$ <b>O</b>	$1,40 \cdot 10^{-2} \pm 1,60 \cdot 10^{-3}$ <b>M<sub>370</sub></b>
$\tau_6$ Assoz. Intermediat	$1,37 \cdot 10^{-2} \pm 5,10 \cdot 10^{-3}$ <b>DS</b>	$1,13 \cdot 10^{-1} \pm 4,53 \cdot 10^{-3}$ <b>O</b>

### 3.3.4 CsR-Ala56His

Protonenpumpen vom Proteorhodopsin-Typ besitzen ein hochkonserviertes His-Asp-Cluster als Teil des Gegenionkomplexes, wobei es sich bei dem involvierten Aspartat um den primären Protonakzeptor (Asp86 in CsR) handelt (Bergo *et al.*, 2009; Hempelmann *et al.*, 2011). Dieses Histidin ist in Pumpen vom BR-Typ hingegen nicht konserviert (Ala56 in CsR). Elektrophysiologische Untersuchungen durch Dr. Arend Vogt demonstrierten für CsR-Ala56His unter einem starken elektrochemischen Gradienten eine, wie auch für PR beschriebene, Umkehrung der Pumporientierung (Friedrich *et al.*, 2002; Lörinczi *et al.*, 2009; Vogt, 2017). Deswegen soll der Einfluss dieser Mutation weitergehend spektroskopisch eruiert werden.

Alanin an Position 56 befindet sich einem Abstand von 3,7 Å zu der Seitenkette des primären Protonakzeptor Asp86 (Abb. 26A). Bei einer Substitution durch Histidin kann davon ausgegangen werden, dass es durch die räumliche Annäherung der funktionellen Gruppen zu einer direkten Wechselwirkung zwischen den beiden Aminosäuren kommt.

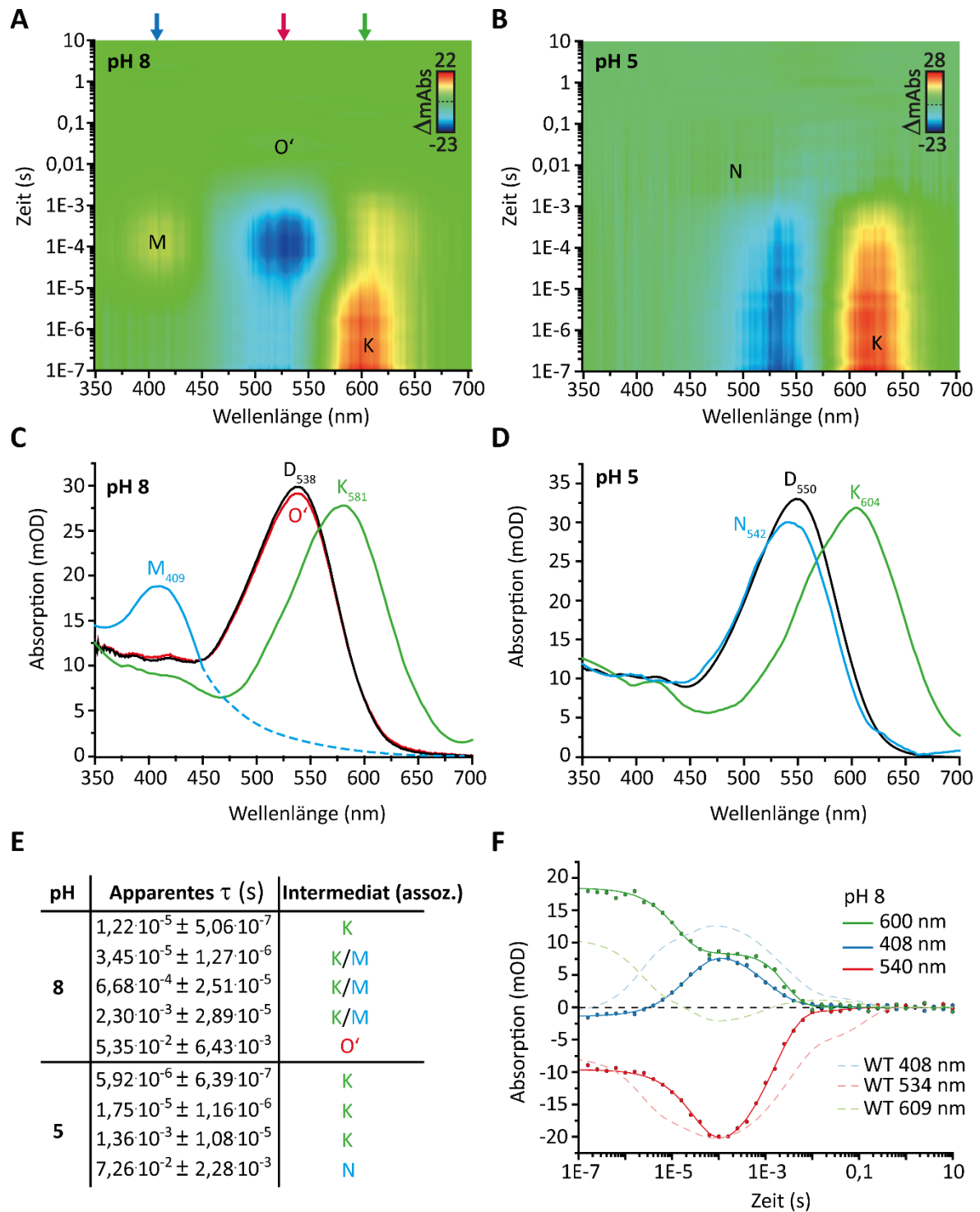


**Abbildung 26** **A** CsR-Monomer. Vergrößerungsprojektion des ausgewählten Bereiches schwarz umrandet. Darstellung von Ala56 und Asp86. **B** Normierte UV-vis-Dunkelspektren der Chromophorabsorption von rekombinantem CsR-Ala56His (durchgezogen) und CsR WT (gestrichelte) bei pH 8 (schwarz) und pH 5 (orange). Die angegebenen Wellenlängen repräsentieren das Absorptionsmaximum der Mutante beim jeweiligen pH-Wert.

Tatsächlich zeigt das Dunkelspektrum der aufgereinigten CsR-Mutante Ala56His bei pH 8 eine leichte Rotverschiebung um 3 nm nach  $\lambda_{\text{max}} = 538 \text{ nm}$  (Abb. 23B), was möglicherweise durch eine räumliche Abkehr des Asp86 von der RSBH<sup>+</sup> erklärt werden kann und somit die vorhergehende Annahme einer direkten Interaktion zwischen Asp86 und His56 unterstützt. Unter sauren Bedingungen (pH 5) kommt es zu einer bathochromen Verschiebung der Dunkelzustandsabsorption um 22 nm nach  $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$ , die mit einer pH-induzierten

Protonierung des primären Protonakzeptors Asp86 konsistent erscheint (analog zu CsR-Arg83Gln, vgl. Abb. 22B). Demnach verursacht die eingeführte, artifizielle His56-Asp86-Wechselwirkung eine Erhöhung des  $pK_S$ -Wertes von Asp86. Analog wurde für das „green proteorhodopsin“ der ungewöhnlich hohe  $pK_S$ -Wert des primären Protonenakzeptors Asp97 durch eine pH-abhängige Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen His75 und Asp97 erklärt (Hempelmann *et al.*, 2011).

Blitzlicht-Photolyse-Messungen an CsR-Ala56His bei pH 8 zeigen eine deutliche Akkumulation und erhöhte Lebensdauer des rotverschobenen frühen Photointermediates K bis in den Millisekundenbereich (Abb. 27A,F). Die Deprotonierung der RSB, die durch die zeitliche Evolution des M-Intermediates nachverfolgt werden kann, tritt erst bei etwa 10  $\mu$ s auf und erreicht ihr Maximum bei etwa 100  $\mu$ s, was eine deutliche Verlangsamung der Deprotonierungskinetik gegenüber dem WT darstellt. Auch die Akkumulation an deprotonierter Spezies ist gegenüber dem WT stark verringert. Die berechneten Absolutspektren der Photointermediate (Abb. 27C) verdeutlichen die aus den Konturplots erkennbaren Intensitätsverhältnisse der einzelnen Intermediate. Die Extinktion des  $K_{581}$ -Intermediates übersteigt dabei deutlich die des  $M_{409}$ -Intermediates. Während im WT das Verhältnis K : M bei ca. 1:1 liegt (WT-Daten bei pH 8 nicht gezeigt, referenziert auf pH 7,4 vgl. Abb. 21B), ist bei CsR-Ala56His die Extinktion von  $K_{581}$  zweifach größer als die des deprotonierten  $M_{409}$ -Intermediates. Dieser Befund könnte indikativ dafür sein, dass nur ein Teil der photoaktivierten Proteine einen Photozyklus durchlaufen, während der größere Teil thermisch in den Grundzustand relaxiert. Ein spätes rotverschobenes O-Intermediat ist bei der Mutante nicht eindeutig zu identifizieren. Eine mögliche kongruente spektrale Überlappung des O- mit dem langlebigen  $K_{581}$ -Intermediat kann hierbei allerdings ausgeschlossen werden, da der kinetische Zerfall der K-assoziierten Spezies deutlich schneller als die Rückkehr des initialen Dunkelzustandes ist (Abb. 27E, F). Stattdessen bildet sich nach der Reprotonierung der RSB sowie der Reisoomerisierung des Chromophors ein als O' bezeichnetes Intermediat, das die gleichen spektralen Eigenschaften wie der DS aufweist und nur durch einen verringerten molaren Absorptionskoeffizienten unterschieden werden kann (Abb. 27C). Ein analoges O'-Intermediat wurde ebenfalls bei spektroskopischen Untersuchungen an PR beschrieben (Dioumaev *et al.*, 2002). Diesem O' wurde in Analogie zum O-Intermediat des BR, ein verdrillter all-trans-Chromophor, sowie ein protonierter primärer Protonakzeptor (Asp98 in CsR) zugeschrieben (Smith, Lugtenburg and Mathies, 1985; Dioumaev *et al.*, 2002). Eine mögliche vorhergehende Deprotonierung von Asp86 in CsR-Ala56His kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. O' relaxiert mit  $\tau_{O'} \sim 54$  ms vollständig nach DS. Der beobachtete Photozyklus der Mutante ist somit deutlich gegenüber dem WT beschleunigt (Abb. 27F).



**Abbildung 27** Konturplots der gemittelten ( $n = 15$ ) spektralen Veränderungen von rekombinantem CsR-Ala56His nach Laserblitz-Anregung für pH 8 (A) und pH 5 (B). Berechnete Absolutspektren der Photointermediate mit ihren jeweiligen Absorptionsmaxima bei pH 8 (C) und pH 5 (D). Das der Berechnung zugrunde liegende Dunkelspektrum (angenommene Anregung 10 %, aller Moleküle) ist in schwarz dargestellt. Wellenlänge der maximalen Absorption für die einzelnen Intermediate angegeben. Erwartetes M-spektrum  $>450$  nm ist skizziert (gestrichelt). E Tabellarische Auflistung der aus der globalen Analyse bestimmten Lebenszeiten und ihrer jeweiligen, assoziierten Photozyklus-Intermediate. F Vergleich der zeitlichen Verläufe dreier charakteristischer Transienten (Pfeile in A) zwischen Ala56His (durchgezogen) und WT (gestrichelt, normiert auf maximale Absorptionsänderung von Ala56His bei 540 nm) bei pH 8.

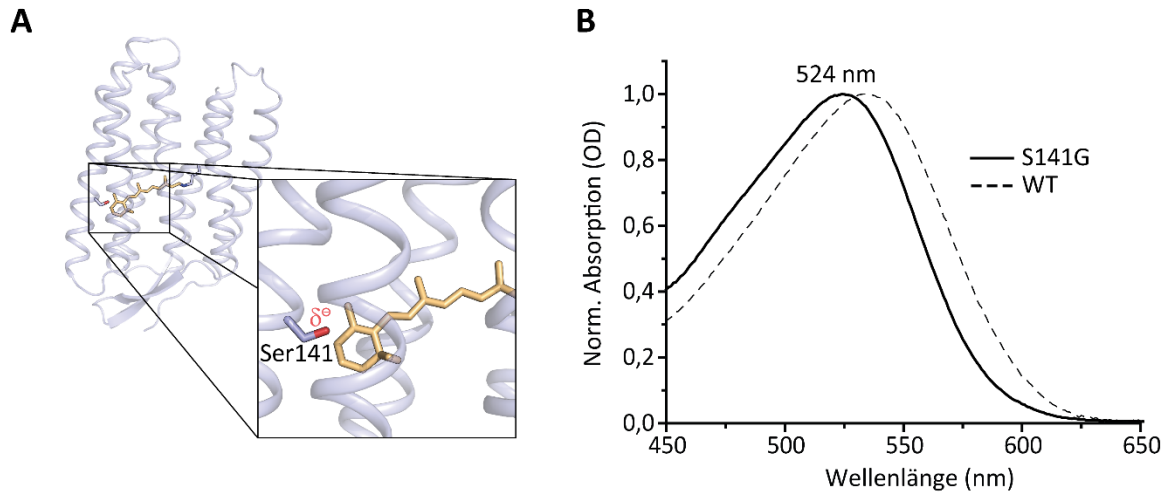
Zeitaufgelöste Blitzlicht-Photolyse-Messungen bei pH 5 zeigen eine verstärkte

Akkumulation des K-Intermediates (Abb. 27B). Dieses  $K_{604}$ -Intermediat ist dabei um etwa 20 nm bathochrom gegenüber dem bei pH 8 beobachteten  $K_{581}$ -Intermediat verschoben. Eine Anreicherung des M-Intermediates kann hierbei nicht beobachtet werden. Auch für PR wurde ein konventioneller mit einem Protonentransport assoziierter Photozyklus nur bei pH > 7 beobachtet (Dioumaev *et al.*, 2002). In CsR-Ala56His relaxiert  $K_{604}$  mit ~1,4 ms in ein zum Dunkelzustand blauverschobenes Intermediat mit einer maximalen Absorption bei 542 nm. Ein im selben Zeitbereich auftretendes und ähnlich absorbierendes Intermediat wurde bereits bei Messungen an CsR-Arg83Gln beobachtet ( $\lambda_{\text{max}} = 548$  nm, Abb. 23D, F). Bei Untersuchungen an PR wurde einem analogen N-Intermediat mit ein 13-*cis*-Chromophor und ein protonierter Protonakzeptor zugeordnet. Allerdings zeigte das für PR beschriebene N-Intermediat, anders als etwa das analoge BR N-Intermediat, ein rotverschobenes Absorptionsmaximum (Dioumaev *et al.*, 2002).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die His56-Asp86-Wechselwirkung die Deprotonierung der RSBH<sup>+</sup> stark beeinträchtigt, was durch die lange Lebensdauer des K-Intermediates und die geringe Akkumulation an M-Intermediat verdeutlicht werden kann. Der bei pH 8 beschriebene beschleunigte Photozyklus könnte dabei den verringerten photoaktivierbaren Proteinanteil kompensieren, was die durch Dr. Arend Vogt beschriebenen großen Pumpströme dieser Mutante, bei 0 mV und quasi symmetrischen pH Bedingungen, teilweise erklären zu vermag (Vogt, 2017).

#### 3.3.5 CsR-Ser141Gly

Nach Absorption eines Photons kommt es durch eine Veränderung des Dipolmomentes im angeregten Zustand zu einer plötzlichen Polarisierung des Retinals, wobei die positive Ladung zum  $\beta$ -Ionon-Ring verschoben wird. Die sich in der Nähe des  $\beta$ -Ionon-Ringes befindliche negative Seitenkette des Ser141 (Abb. 28A) ist somit in der Lage das elektronische Niveau des angeregten Zustandes zu stabilisieren und so die energetische Differenz zwischen elektronischem Grund- und angeregtem Zustand zu verringern. Die Substitution des Ser141 mit einem unpolaren Rest wie dem Glycin hebt diese stabilisierende Konfiguration auf, so dass es zu einer Vergrößerung des Energieunterschiedes zwischen den beiden elektronischen Niveaus kommt. Entsprechend kommt es im Falle von CsR-Ser141Gly, wie in Abbildung 28B zu sehen ist, zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums um 11 nm zu 524 nm.

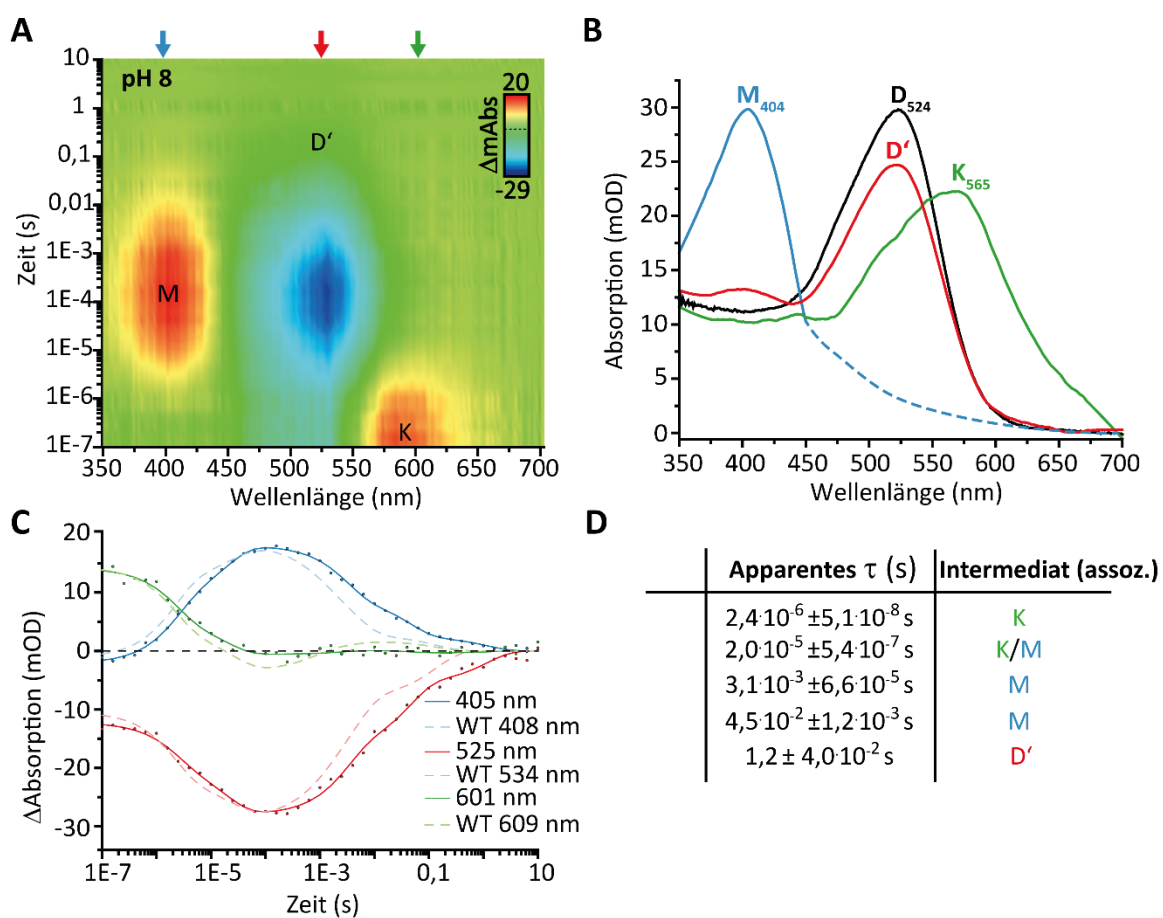


**Abbildung 28** **A** CsR-Monomer. Vergrößerungsprojektion des ausgewählten Bereiches schwarz umrandet. Darstellung von Ser141 mit partieller negativer Ladung. **B** Normierte UV-vis-Dunkelspektren der Chromophorabsorption von rekombinantem CsR-Ser141Gly (durchgezogen) und CsR-WT (gestrichelte) bei pH 8 (schwarz). Die angegebene Wellenlänge repräsentiert das Absorptionsmaximum der Mutante.

Die zu Ser141 in CsR analoge Position wurde in verschiedenen mikrobiellen Rhodopsinen vorrangig im Kontext stationärer Absorptionseigenschaften untersucht. Studien an BR und an farbverschobenen Varianten einer Kanalrhodopsinchimäre (C1V1) aus Fragmenten des ChR1 und Kanalrhodopsin 1 aus *Volvox carteri* (VChR1) zeigten bei Substitution des Serins gegen Glycin (C1V1-Ser220Gly) bzw. Alanin (BR-Ser141Ala) neben Veränderungen der stationären Absorption auch kinetische Unterschiede zum parental Protein auf (Marti *et al.*, 1991; Prigge *et al.*, 2012). Um den Einfluss der partiell negativen Ladung am  $\beta$ -Ionon-Ring auf den Photozyklus von CsR zu untersuchen, wurden Blitzlicht-Photolyse-Messungen von CsR-Ser141Gly bei pH 8 durchgeführt, die in Abbildung 29 dargestellt sind. Bereits anhand des Konturplots ist eine starke Ausprägung der K- und M-Intermediate erkennbar, während ein spätes rotverschobenes O-Intermediat nicht zu beobachten ist. Dabei hat K mit  $\tau_K \sim 2,4 \mu\text{s}$  (Abb. 29A, C, D) eine gegenüber dem WT leicht erhöhte Lebensdauer, was in einer verzögerten Akkumulation des M-Intermediates resultiert (Abb. 29A, C, D). Das berechnete Absolutspektrum des M-Intermediates besitzt seine maximale Absorption bei 404 nm und ist somit anders als der Dunkelzustand nicht zu dem im WT beobachteten M-Intermediat verschoben (vgl. Abb. 21B). Die Lebensdauer des M-Intermediates ist in der Mutante jedoch außerordentlich lang. Die letzte hauptsächlich M-assoziierte kinetische Komponente zerfällt erst mit  $\tau_{M2} \sim 45 \text{ ms}$  (Abb. 29B, D). Indessen ist selbst im Absolutspektrum des letzten Photointermediates D' eine geringe Kontribution des M-Intermediates zu beobachten (Abb. 29B). D' geht erst mit  $\tau_{D'} \sim 1,2 \text{ s}$  in den DS über, was eine fast zehnfache Verlangsamung gegenüber dem WT ( $\tau_{WT} \sim 140 \mu\text{s}$ ) darstellt (Abb. 29C, D). Die Untersuchungen an der BR-Mutante Ser141Ala zeigten ebenfalls eine starke Beeinträchtigung



der Photozyklusdynamik, wobei es zu einer sechsfachen Verlangsamung des thermischen Zerfalls des M-Intermediates kam (Marti *et al.*, 1991). Weiter demonstrierten die Messungen an C1V1-Ser220Gly eine gegenüber dem WT etwa dreifach verlangsamte Rückkehr der transienten Stromamplitude, die mit einer Rückkehr in den initialen Dunkelzustand gleichgesetzt wurde (Prigge *et al.*, 2012). Bemerkenswerterweise zeigt AR-1, bei dem an dieser Position nativ ein Glycin (Gly144) sitzt, ebenfalls eine starke Akkumulation an M-Intermediat, das bei pH 7 und 400 mM NaCl mit etwa 80 ms in einen D'-ähnlichen Zustand relaxiert (Furuse *et al.*, 2015). Inwieweit die erhöhte Salzkonzentration (150 mM NaCl für die dargestellten Messungen des CsR) dabei Einfluss auf die Kinetik des Photozykluses nimmt bleibt ungeklärt.



**Abbildung 29** **A** Konturplots der gemittelten ( $n = 15$ ) spektralen Veränderungen von rekombinantem CsR-Ser141Gly nach Laserblitz-Anregung für pH 8. **B** Berechnete Absolutspektren der Photointermediate mit ihren jeweiligen Absorptionsmaxima bei pH 8. Das der Berechnung zugrunde liegende Dunkelspektrum (angenommene Anregung 10 %, aller Moleküle) ist in schwarz dargestellt. Wellenlänge der maximalen Absorption für die einzelnen Intermediate angegeben. Erwartetes M-Spektrum >450 nm ist skizziert (gestrichelt). **C** Vergleich der zeitlichen Verläufe dreier charakteristischer Transienten (Pfeile in A) bei pH 8 zwischen Ser141Gly (durchgezogen) und WT (gestrichelt, normiert auf maximale Absorptionsänderung von Ser141Gly bei 525 nm). **D** Tabellarische Auflistung der aus der globalen Analyse bestimmten Lebenszeiten und ihrer jeweiligen, assoziierten Photozyklus-Intermediate.

Es ist zu konstatieren, dass stationäre Einflüsse des Ser141 auf den Chromophor sowohl für den Grundzustand durch eine Wechselwirkung zwischen dem Sauerstoff des



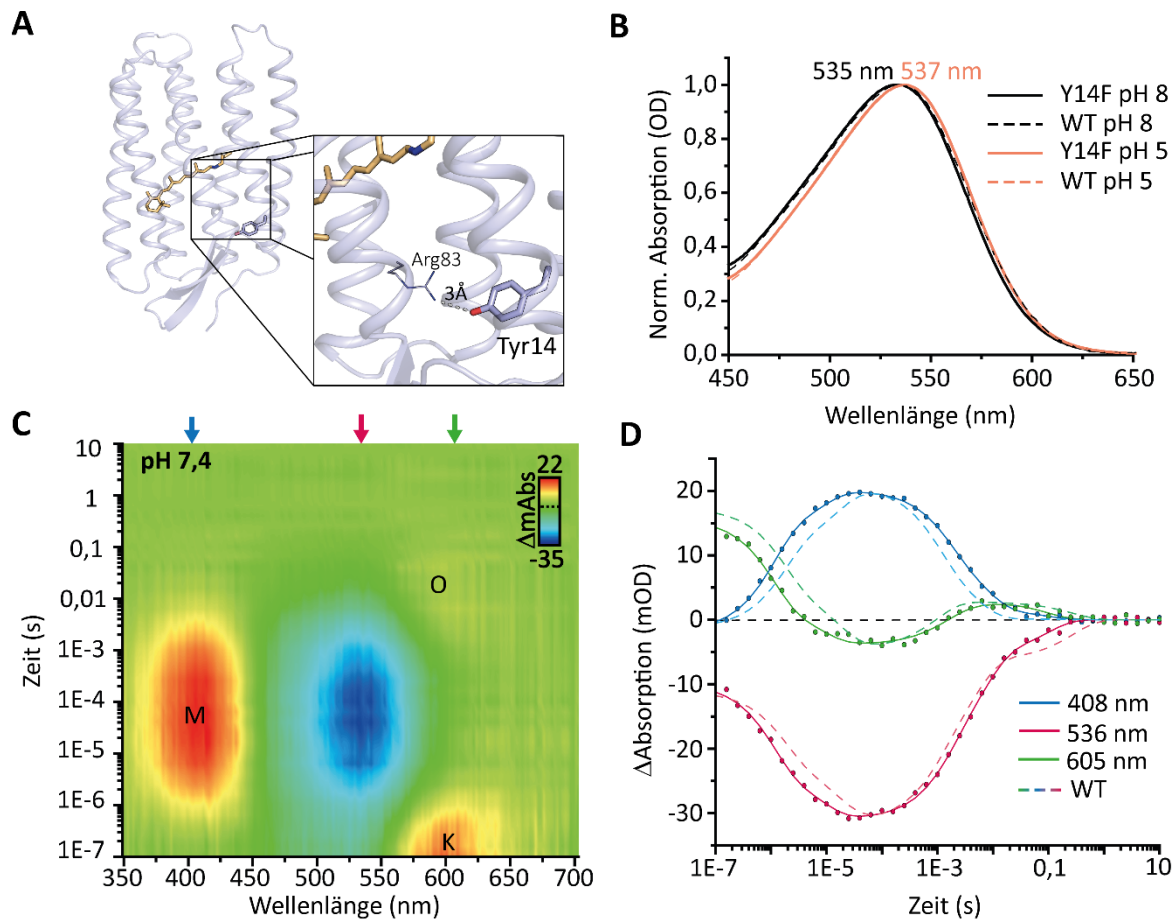
Ser141 und dem elektrophilen C<sub>5</sub>-Kohlenstoffatome des protonierten Chromophores (Patzelt *et al.*, 2002), als auch für den polarisierten angeregten Chromophor (siehe oben), nachvollziehbar sind. Der Einfluss dieses Restes auf die Dynamik der Reprotonierung ist hingegen nicht untersucht. Es ist nicht auszuschließen, dass sekundäre Effekte dieses langlebige M-Intermediat und die verlangsamte thermische Reisomerisierung bedingen. Ser141 formt eine H-Brücke zum Rückgratsauerstoff des Met119 (Appendix Abb. A4). Durch das mit der Substitution zu Glycin induzierte Wegfallen dieser Wechselwirkung, die die einzige H-Brücke zwischen Helix 4 und 5 in CsR darstellt, kann es ebenfalls zu einer Neuausrichtung des Met119 kommen. Der Einfluss des Met119 auf die Photochemie lichtgetriebener Pumpen wurde bereits in Abschnitt 3.2.3 thematisiert. Für CsR wurde der kinetische Effekt einer Substitution des Met119 auf Grundlage der Kanalmutante CsR-Tyr14Glu (vgl. Abs. 3.4) erbracht. Dabei zeigte CsR-Tyr14Glu/Met119Thr eine gegenüber der parentalen Kanalmutante zwölfmal verlangsamte Abklingkinetik des Kanalstromes (private Mitteilung Dr. Arend Vogt, nicht gezeigt).

### 3.3.6 CsR-Tyr14Phe

Die in CsR vorhandene Wechselwirkung zwischen Tyr14 und dem hochkonservierten Arg83 (Abb. 30A) ist für lichtgetriebene Protonenpumpen einzigartig und wurde bereits in Abschnitt 3.2.2.2 näher beschrieben. Um den Einfluss dieser Wechselwirkung auf die Dynamik des Photozyklus zu untersuchen, wurde Tyr14 durch Phenylalanin ersetzt. Da diese Substitution eine Dehydroxylierung des Tyrosins darstellt, wird die H-Brückenwechselwirkung zu Arg83 aufgelöst während die Sterik der Seitenkette weitestgehend erhalten bleibt. Die Dunkelspektren von CsR-Tyr14Phe sind mit der Dunkelzustandsabsorption des WT identisch (Abb. 30B) und zeigen ihre maximale Absorption bei 535 nm (pH 8) und 537 nm (pH 5).

Zeitaufgelöste Messungen an der Mutante zeigen einen gegenüber dem WT beschleunigten Übergang von K nach M ( $\tau_{K/M} \sim 8,6 \mu\text{s}$ ,  $\tau_{K/M-WT} \sim 1,8 \text{ ms}$ , vgl. Tab. 1) und somit eine Beschleunigung der Deprotonierung der RSBH<sup>+</sup> (Abb. 30C, D). Zeitaufgelöste röntgenkristallografische Messungen an BR legen die Vermutung nahe, dass der geschwindigkeitslimitierende Schritt in der Deprotonierung der Schiff'schen Base eine konformationelle Änderung des Proteinrückgrates ist, bei der Helix 3 sich in Richtung Helix 7 beugt (Royant *et al.*, 2000; Nango *et al.*, 2016). Diese Beobachtung liefert eine mögliche Erklärung für die beschleunigte Deprotonierung der RSBH<sup>+</sup> in CsR-Tyr14Phe. Durch den Wegfall der H-Brücke zwischen Tyr14 (Helix 1) und Arg83 (Helix 3) könnte es zu einer

erhöhten Variabilität von Helix 3 kommen, die die eben beschriebenen konformationellen Änderungen und so die Deprotonierung der RSBH<sup>+</sup> erleichtern würden.



**Abbildung 30** **A** CsR-Monomer. Vergrößerungsprojektion des ausgewählten Bereiches schwarz umrandet. Darstellung der zwischen Tyr14 und Arg83 ausgebildeten H-Brücke (graue Striche) **B** Normierte UV-vis-Dunkelspektren der Chromophorabsorption von rekombinantem CsR-Tyr14Phe (durchgezogen) und CsR WT (gestrichelt) bei pH 8 (schwarz) und pH 5 (orange). Die angegebenen Wellenlängen repräsentieren das Absorptionsmaximum der Mutante beim jeweiligen pH-Wert. **C** Konturplots der gemittelten ( $n = 15$ ) spektralen Veränderungen von rekombinantem CsR-Tyr14Phe nach Laserblitz-Anregung für pH 7,4. **D** Vergleich der zeitlichen Verläufe dreier charakteristischer Transienten (Pfeile in C) bei pH 7,4 zwischen Tyr14Phe(durchgezogen) und WT (gestrichelt, normiert auf maximale Absorptionsänderung von Tyr14Phe bei 536 nm).

Weiterhin zeigt das M-Intermediat in CsR-Tyr14Phe eine gegenüber dem WT erhöhte Lebensdauer (Abb. 30 D) und zerfällt mit zwei apparanten Zeitkonstanten von  $\tau_{1M} \sim 1,5$  ms und  $\tau_{2M} \sim 7,5$  ms ( $\tau_{M1-WT} \sim 0,9$  ms,  $\tau_{M2-WT} \sim 4,4$  ms, vgl. Tab. 1). Das O-Intermediat ist in der Mutante wiederum schwächer ausgeprägt als im WT (Abb. 30C, D). Die Lebensdauer des O-Intermediates und die damit verbundene scheinbare Gesamtdauer des Photozyklus ist in CsR-Tyr14Phe in etwa zweifach kürzer als im WT ( $\tau_0 \sim 98$  ms,  $\tau_{0-WT} \sim 233$  ms, vgl. Tab. 1). Der mechanistische Zusammenhang zwischen der oben angesprochenen erhöhten Variabilität der extrazellulären Hälfte und der verkürzten Lebensdauer des O-Intermediates lässt sich nicht abschließend klären, da die molekulare Konfiguration des O-Intermediates und vor allem die

Rückkehr in den Dunkelzustand nicht hinreichend gut verstanden sind. Eine mögliche veränderte Konfiguration des Arg83 im O-Intermediat, die zu Veränderungen der  $pK_s$ -Werte des Gegenions und/oder der PRC führt, könnte ein plausibler Grund für die verkürzte Lebensdauer des O-Intermediates sein. Tabelle 12 fasst die exakten, durch die globale Analyse bestimmten Zeitkonstanten zusammen.

**Tabelle 12** Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-Tyr14Phe bei pH7,4, ermittelt aus der globalen Analyse mit 5 Komponenten. Assoziierte Photozyklusintermediate mitaufgeführt.

<b>CsR-Tyr14Phe</b>	<b>pH 7,4 (s)</b>
$\tau_1$ Assoz. Intermediat	$1,09 \cdot 10^{-6} \pm 1,65 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>
$\tau_2$ Assoz. Intermediat	$8,61 \cdot 10^{-6} \pm 2,53 \cdot 10^{-7}$ <b>K/M</b>
$\tau_3$ Assoz. Intermediat	$1,51 \cdot 10^{-3} \pm 5,03 \cdot 10^{-5}$ <b>M</b>
$\tau_4$ Assoz. Intermediat	$7,45 \cdot 10^{-3} \pm 2,39 \cdot 10^{-4}$ <b>M/O</b>
$\tau_5$ Assoz. Intermediat	$9,80 \cdot 10^{-2} \pm 2,95 \cdot 10^{-3}$ <b>O</b>

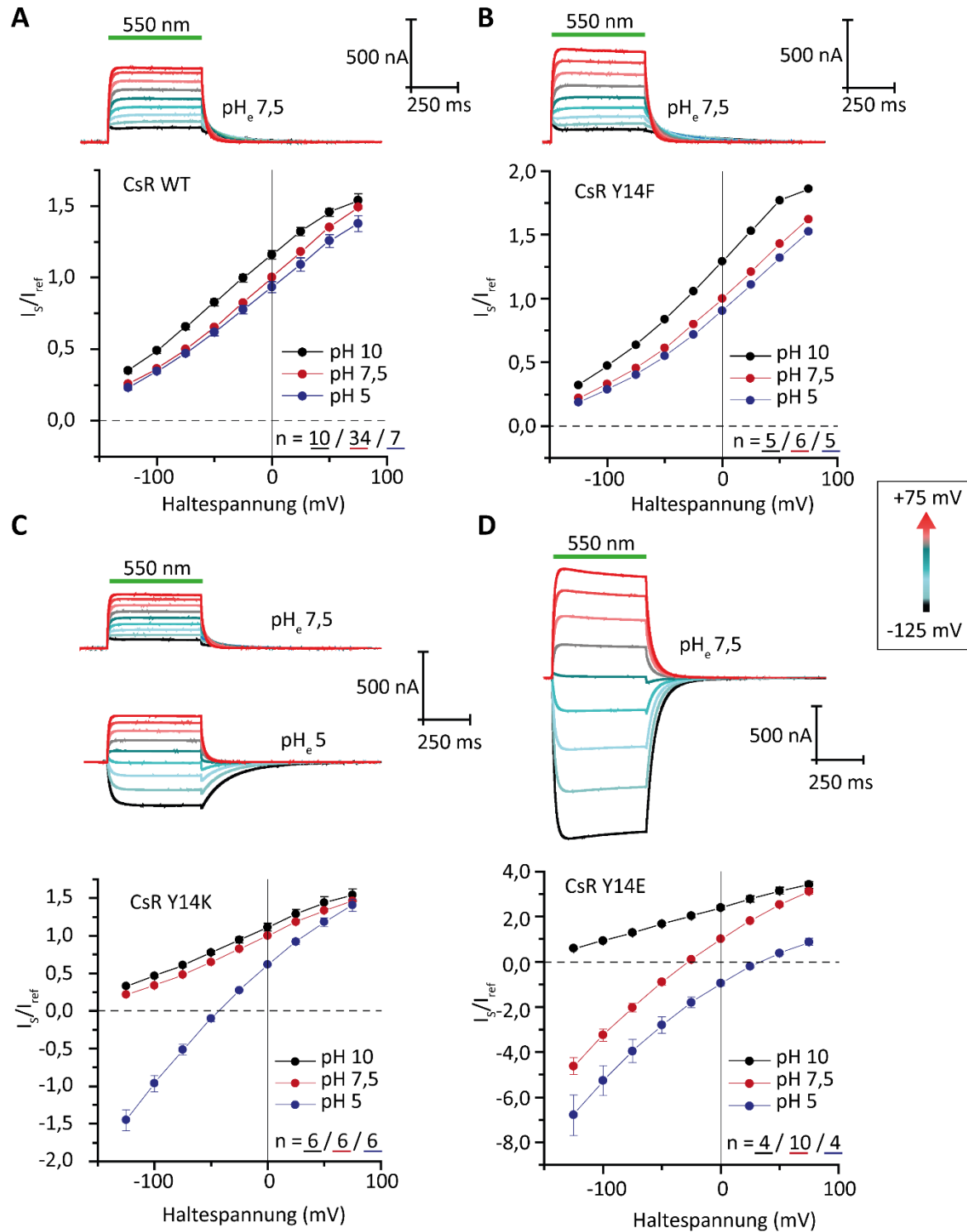
Als Konsequenz dieses beschleunigten Photozykluses würde man in elektrophysiologischen Messungen unter Lichtsättigung im Vergleich zum WT vergrößerte Ströme erwarten. Erste Messungen an der Mutante in *Xenopus* Oozyten durch Dr. Arend Vogt zeigen tatsächlich WT-ähnliche Pumpströme mit leicht erhöhten Amplituden (vgl. Abb. 31B).

Abschließend ist festzuhalten, dass die H-Brücke zwischen Tyr14 und Arg83 keine essentielle Rolle in dem gerichteten Protonentransport von CsR spielt. Die hier beschriebenen spektroskopischen Daten der CsR-Tyr14Phe Mutanten verdeutlichen aber auch, dass diese H-Brücke einen Einfluss auf die Dynamik des Photozyklus hat und somit einen weiteren mechanistischen Unterschied zwischen CsR und anderen lichtgetriebenen Protonenpumpen darstellt.

### 3.4 Strukturbasiertes Design und Erstcharakterisierung neuer Kanalmutanten

Die von Dr. Arend Vogt durchgeführten elektrophysiologischen Studien an CsR machten deutlich, dass die Komposition der extrazellulären Hälfte passive Rückströme verhindert und so für die Unidirektionalität des Pumpstromes unerlässlich ist (Vogt *et al.*, 2015). Insbesondere trägt dabei die die Konfiguration der großen polaren Seitengruppe von Arg83 zur Konfiguration extrazellulären Hälfte bei. Die in der Kristallstruktur aufgezeigte einzigartige H-Brücke zwischen Tyr14 und Arg83 (Abb. 14A, Abb. 41) könnte daher einen potenten Ausgangspunkt für eine weiterführende Entwicklung passiver Protonentransporter darbieten. Die beobachteten Änderungen in der Funktionsweise der CsR-Tyr14Phe Mutante zeigen auf, dass das Wegfallen dieser Wechselwirkung tatsächlich einen subtilen mechanistischen Einfluss auf die Funktionsweise des Proteins hat, der auch eine veränderte Konfiguration des Arg83 suggerieren könnte. Diese Position erlaubt somit eine direkte Einflussnahme auf Arg83 ohne dabei in direkte Wechselwirkung mit anderen essentiellen Resten des Gegenionkomplexes oder PRC zu treten. Entsprechend wurden im Laufe dieser Arbeit weitere Mutationen von Tyr14 in CsR entworfen, die zunächst durch Dr. Arend Vogt elektrophysiologisch charakterisiert wurden (Abb. 31). Die in diesem Abschnitt vorgestellten elektrophysiologischen Messungen, wurden an Oozyten durchgeführt, so dass sich veränderte pH-Bedingungen ausschließlich auf die Pufferbedingungen des extrazellulären Mediums beziehen ( $\text{pH}_e$ ).

CsR-Tyr14Phe verhielt sich auch in elektrophysiologischen Untersuchungen ähnlich zum WT (Abb. 31A) und zeigte lichtinduzierte auswärts gerichtete Pumpströme, die bei pH 5, 7,5 und 10 über Haltepotentiale von -125 bis +75 mV Bestand hatten (Abb. 31B). Die Amplituden der stationären Ströme sind dabei gegenüber dem WT erhöht, was durch eine beschleunigte Rückkehrkinetik in den Dunkelzustand erklärt wurde (vgl. Abb. 30D). Als nächstes wurde Tyr14 durch den positiven Rest Lysin substituiert. Dabei wurde angenommen, dass es durch repulsive Kräfte zwischen den beiden positiv geladenen Resten Lys14 und Arg83 zu einer Neuausrichtung der extrazellulären Hälfte kommt, die eventuell bidirektionale Ströme erlaubt, wie sie auch in anderen vergleichbaren Mutanten beobachtet werden konnten (vgl. CsR-Ala56His\Tyr57Lys\Tyr207His; Vogt, 2017). CsR-Tyr14Lys zeigte in Oozyten bei  $\text{pH}_e$  7,5, was eine komparable Protonenkonzentration zum inneren der Oozyten darstellt, ausschließlich auswärts gerichtete Photoströme (Abb. 31C). Dabei waren die Amplituden der stationären Ströme gegenüber dem WT verkleinert, was teilweise auf eine konformationelle Destabilisierung zurückgeführt werden kann, die auch bei rekombinantem Protein beobachtet wurde (Appendix Abb. A5).



**Abbildung 31 Oben:** Representative Stromspuren bei Belichtung mit 550 nm von -125 mV bis +75 mV Haltespannung für CsR-WT (A), CsR-Tyr14Phe (B), CsR-Tyr14Lys (C) und CsR-Tyr14Glu (D) aus Experimenten an Oozyten, durchgeführt und ausgewertet durch Dr. Arend Vogt. Belichtungsdauer durch grünen Balken dargestellt. **Unten:** Dazugehörige Strom-Spannungs-Kennlinien der einzelnen Konstrukte bei verschiedenen äußeren pH-Bedingungen (pH 5, pH 7,5 und pH 10). Datenpunkte oberhalb der 0-Linie repräsentieren auswärtsgerichtete Ströme, Punkte unterhalb der 0-Linie entsprechend einwärtsgerichtete Ströme.

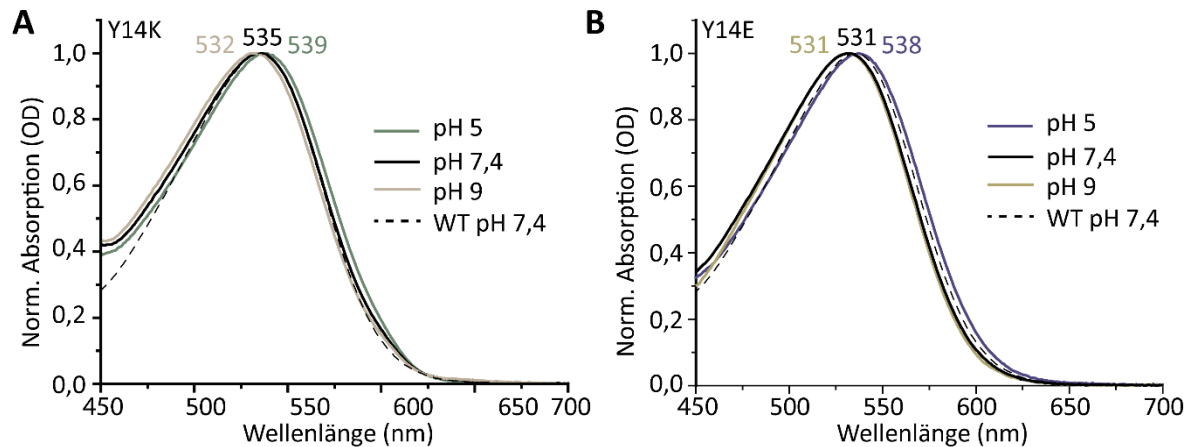
Bei pH<sub>e</sub> 5 und starken negativen Haltepotentialen (> -50 mV) konnten einwärtsgerichtete Ströme beobachtet werden. Demnach bedarf es bei der Mutante für ein

Aufbrechen der extrazellulären Barriere offenbar sekundärer struktureller Änderungen, die durch den starken elektrochemischen Gradienten induziert werden. Weiterhin zeigte die Abklingkinetik des Kanalschlusses eine starke Spannungsabhängigkeit und verdeutlicht so anschaulich, dass die Spannungsabhängigkeit des stationären Stromes eine spannungsabhängige Modulation der Photozykluskinetik ist.

In einem nächsten Schritt wurde die attraktive Wechselwirkung zwischen Arg83 und Position 14 durch den Einbau eines Glutamtes verstärkt. So sollte eine besser definierte Neuausrichtung des Arg83 geschaffen werden, als es durch die Implementierung einer repulsiven Wechselwirkung wie im Fall von CsR-Tyr14Lys möglich war. Dem lag die Annahme zu Grunde, dass es durch die starken elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Arg83 und Glu14 zu einer Annäherung der beiden Reste kommt, wodurch die Guanidingruppe des Arg83 zu Helix 1 orientiert wird und so der aktive Transport des Proteins möglicherweise unterbunden wird. CsR-Tyr14Glu zeigte tatsächlich bereits unter quasi symmetrischen pH-Bedingungen ( $\text{pH}_e$  7,5) stark ausgeprägte passive bidirektionale Photoströme (Abb. 31D), die in dieser Qualität in keiner der vorhergehenden Kanalmutanten des CsR beobachtet werden konnten (Vogt, 2017). Nichtsdestotrotz wurden  $\sim -25$  mV als Umkehrpotential ermittelt. Entsprechend wurden bei 0 mV noch auswärtsgerichtete Ströme verzeichnet, die unter der Annahme symmetrischer pH-Bedingungen nur durch eine lichtaktivierte Pumpaktivität des Proteins erklärt werden können. Konsequenterweise muss also davon ausgegangen werden, dass es innerhalb des Proteins zu einer Überlagerung von aktiven Pump- und passiven Kanalströmen kommt. Weiterhin konnte durch die Annäherung der Umkehrpotentiale an die durch die Nernst-Gleichung vorgegebenen theoretischen Umkehrpotentiale reiner Protonenkanäle, dargelegt werden, dass der residuale Pumpanteil am Gesamtstrom unter sauren pH-Bedingungen zunimmt (private Mitteilung Dr. Arend Vogt, nicht gezeigt). Ein rein passiver Protonentransport findet demnach erst unter alkalischen Bedingungen mit einem  $\text{pH} \geq 8$  statt. Dieses Phänomen wird im Zuge der Diskussion passiver Protonentransport-mechanismen in Abschnitt 4.3 aufgegriffen.

Um den Einfluss der eingeführten Mutationen mechanistisch besser verstehen zu können, wurden die Mutanten CsR-Tyr14Lys/Glu aus HEK293T-Zellen aufgereinigt. Die Absorptionsspektren der beiden Mutanten sind in Abbildung 32 dargestellt. CsR-Tyr14Lys zeigt bei pH 7,4 eine identische Dunkelzustandsabsorption wie der WT mit  $\lambda_{\text{max}} = 531$  nm (Abb. 32A). Dies war unter der Annahme einer direkten Wechselwirkung des Lys14 mit Arg83 und einer daraus resultierenden Neuorientierung der Arg83-Guanidingruppe nicht zu erwarten, da die Orientierung des Arg83 auch die Konfiguration des Gegenionkomplexes beeinflusst und so indirekt Einfluss auf die Elektrostatik der RSBH<sup>+</sup> nimmt. In Anbetracht dessen, dass sich die Seitenkette des Lysins vorrangig aus Kohlenstoff-einfachbindungen zusammensetzt und somit

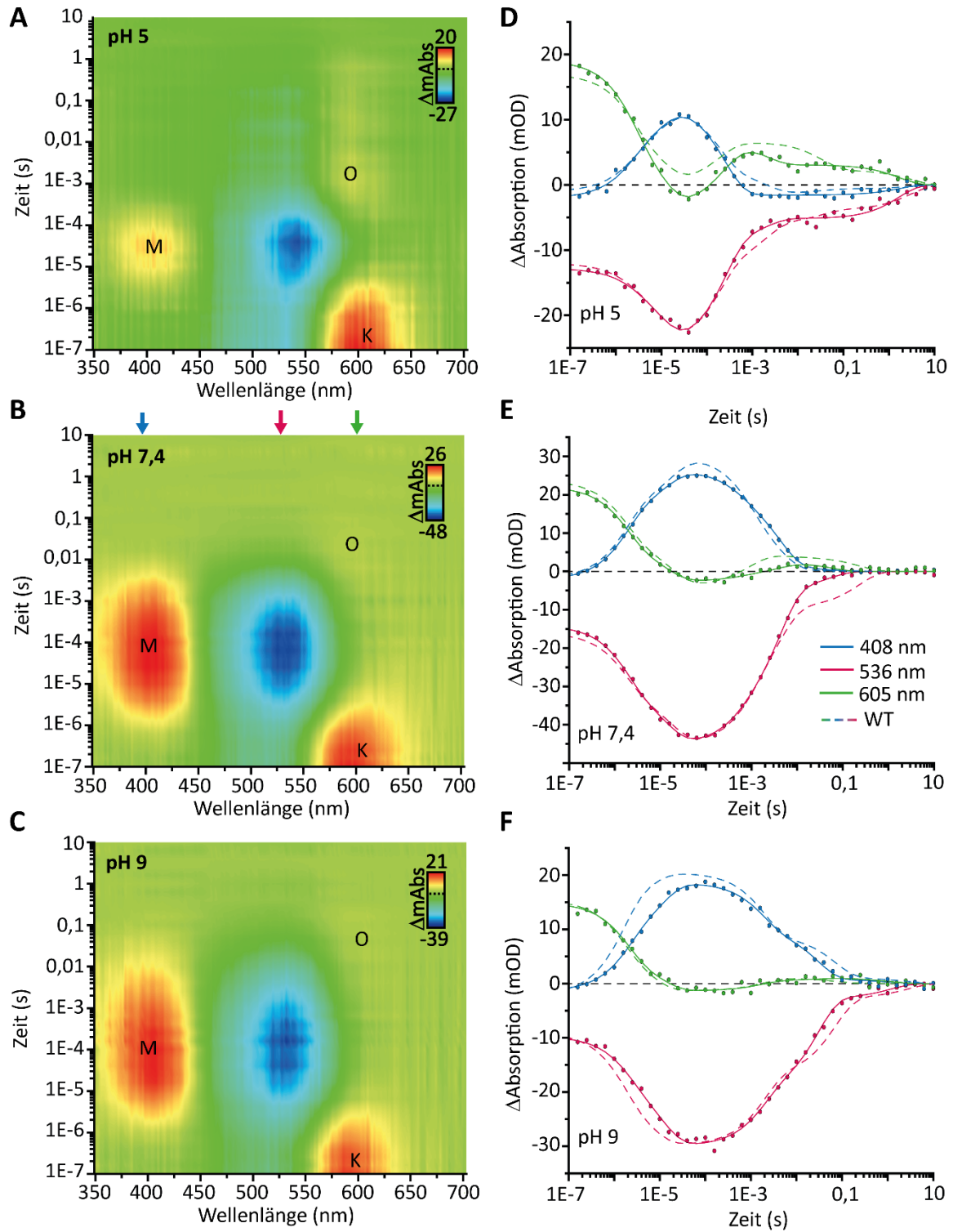
viele konformationelle Freiheitsgrade besitzt, ist es allerdings durchaus vorstellbar, dass im Sinne der Energieminimierung eine Konformation eintritt, bei der die repulsive Wechselwirkung minimiert wird. Die pH-Abhängigkeit der Dunkelzustandsabsorption dieser Mutante ist ebenfalls mit dem WT vergleichbar, wobei die Absorption von CsR-Tyr14Lys unter sauren Bedingungen (pH 5) um 3 nm stärker bathochrom verschoben ist ( $\lambda_{\text{max}} = 539$  nm, Abb. 32A).



**Abbildung 32** Normierte stationäre Absorptionsspektren von rekombinantem Tyr14Lys (A) und Tyr14Glu (B) bei pH 5 (20 mM MES, 150 mM NaCl, 0,03 % DDM), pH 7,4 (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,03 % DDM) und pH 9 (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,03 % DDM). Wellenlänge der maximalen Absorption in der jeweiligen Farbe angegeben. Normiertes Absorptionsspektrum des WT bei pH 7,4 (gestrichelt).

Im Fall von CsR-Tyr14Glu zeigt das aufgereinigte Protein eine gegenüber dem WT leichte hypsochrome Verschiebung zu  $\lambda_{\text{max-pH 7,4}} = 531$  nm (Abb. 32B), was in Analogie zu CsR-Arg83Gln (vgl. Abb. 22B) mit einer Abkehr der positiven Ladung vom Gegenionkomplex korreliert werden könnte. Dabei ist auffällig, dass keine pH-abhängige Verschiebung der Absorption unter alkalischen Bedingungen auftritt, während die Absorption unter sauren Bedingungen leicht bathochrom zu 538 nm verschoben ist (Abb. 32B).

Zeitaufgelöste Blitzlicht-Photolyse-Messungen an der Mutante bei pH 5, 7,4 und 9 sind in Abbildung 33 dargestellt. Dabei zeigen die Konturplots eine mit dem WT vergleichbare Photochemie auf (Abb. 33 A, B, C, vgl. Abb. 20), bei der die drei Photointermediate K, M und O spektral eindeutig unterscheidbar sind. Auffällig ist die im Vergleich zum WT geringe O-Akkumulation bei pH 7,4 (Abb. 33B), die sich auch in der reduzierten Intensität der 605 nm Trajektorie im späten Zeitbereich zeigt (Abb. 33C). Die ersten in diesem Experiment beobachtbaren Schritte des Photozyklus scheinen bei pH 7,4 zwischen CsR-Tyr14Glu und WT quasi identisch. Auch die aus der globalen Analyse berechneten ersten zwei Zeitkonstanten zeigen nur geringe Abweichungen zu denen für den WT bestimmten Übergangsgeschwindigkeiten ( $\tau_K \sim 1,8$   $\mu\text{s}$ ,  $\tau_{K/M} \sim 14$   $\mu\text{s}$ ,  $\tau_{K-WT} \sim 1,8$   $\mu\text{s}$ ,  $\tau_{K/M-WT} \sim 18$   $\mu\text{s}$ , vgl. Tab. 1).



**Abbildung 33** Konturplots der gemittelten ( $n = 15$ ) spektralen Veränderungen von rekombinantem Tyr14Glu nach Laserblitz-Anregung für pH 5 (A) pH 7,4 (B) und pH 9 (C). Pufferbedingungen wie in Abb. 18C beschrieben. D,E,F Darstellung charakteristischer Trajektorien für pH 5 (D), pH 7,4 (E) und pH 9 (F). Zuordnung der Wellenlängen im Konturplot durch Pfeile in B angegeben. Der kinetische Verlauf des WT (gestrichelt, normiert auf maximale Änderung bei 536 nm) zum Vergleich mitangeführt.

Der Zerfall des M-Intermediates erfolgt bei CsR-Tyr14Glu biphasisch, wobei die schnelle Komponente mit  $\tau_{M1} \sim 0,6$  ms gegenüber dem WT ( $\tau_{M1-WT} \sim 0,9$  ms) beschleunigt ist,



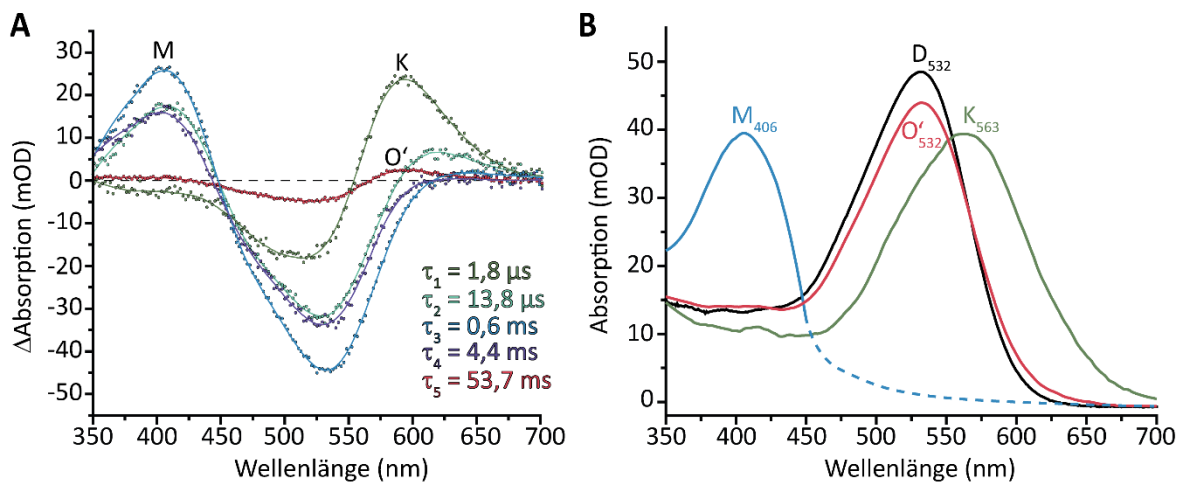
was die geringere M-Akkumulation in der Mutante erklärt (Abb. 33E). Die langsamere Komponente ist hingegen mit der Zerfallskinetik des WT identisch ( $\tau_{M2} \sim 4,4$  ms). Wie bereits angesprochen, zeigt sich der größte Unterschied zum WT im Zerfall des O-Intermediates. Die für CsR-Tyr14Glu berechnete Zeitkonstante des O-Zerfalls ist mit  $\tau_O \sim 54$  ms dabei etwa vierfach gegenüber dem WT ( $\tau_O \sim 233$  ms) beschleunigt. Bei pH 5 scheint die Kinetik des Photozyklus gegenüber dem WT unverändert (Abb. 33D). Unterschiede in den berechneten Zeitkonstanten können aus der für den WT eingeführten sechsten Zeitkonstante resultieren (vgl. Tab. 1). Allerdings ist auch bei pH 5 eine gegenüber dem WT verringerte Akkumulation des O-Intermediates erkennbar, die nichtsdestotrotz bis in den späten Sekundenbereich sichtbar bleibt ( $\tau_{O-pH5} \sim 1,7$  s).

Die deutlichsten Unterschiede der Photozyklusdynamik zwischen Mutante und WT werden bei pH 9 sichtbar. Während der Zerfall des K-Intermediates dabei nur leicht verlangsamt ist ( $\tau_{K-pH9} \sim 1,9$   $\mu$ s,  $\tau_{K-pH9-WT} \sim 1,6$   $\mu$ s), ist der Übergang in das M-Intermediat mit  $\tau_{K/M-pH9} \sim 12$   $\mu$ s fast zweifach langsamer als im WT ( $\tau_{K/M-pH9-WT} \sim 7$   $\mu$ s), was deutlich in der Trajektorie bei 408 nm zu erkennen ist (Abb. 33F). Der initiale Zerfall des M-Intermediates stimmt wiederum mit der für den WT bestimmten Zeitkonstante überein. Ähnlich wie beim Wildtyp ist in der Mutante die vollständige Restauration der Dunkelzustandsabsorption erst im Sekundenbereich erreicht ( $\sim 3,3$  s). Die exakten, durch die globale Analyse bestimmten Zeitkonstanten sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13** Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-Tyr14Glu bei pH 5, 7,4 und 9, ermittelt aus der globalen Analyse mit 5 Komponenten. Assoziierte Photozyklusintermediate mitaufgeführt.

<b>CsR-Tyr14Glu</b>	<b>pH 5 (s)</b>	<b>pH 7,4 (s)</b>	<b>pH 9 (s)</b>
$\tau_1$ Assoz. Intermediat	$2,21 \cdot 10^{-6} \pm 5,99 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>	$1,84 \cdot 10^{-6} \pm 2,83 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>	$1,95 \cdot 10^{-6} \pm 2,39 \cdot 10^{-8}$ <b>K</b>
$\tau_2$ Assoz. Intermediat	$1,05 \cdot 10^{-5} \pm 3,18 \cdot 10^{-7}$ <b>K/M</b>	$1,38 \cdot 10^{-5} \pm 4,16 \cdot 10^{-7}$ <b>K/M</b>	$1,18 \cdot 10^{-5} \pm 1,96 \cdot 10^{-7}$ <b>K/M</b>
$\tau_3$ Assoz. Intermediat	$2,55 \cdot 10^{-4} \pm 3,24 \cdot 10^{-6}$ <b>M</b>	$5,51 \cdot 10^{-4} \pm 2,85 \cdot 10^{-5}$ <b>M</b>	$1,85 \cdot 10^{-3} \pm 1,81 \cdot 10^{-5}$ <b>M</b>
$\tau_4$ Assoz. Intermediat	$2,02 \cdot 10^{-3} \pm 6,45 \cdot 10^{-5}$ <b>O</b>	$4,38 \cdot 10^{-3} \pm 1,03 \cdot 10^{-4}$ <b>M</b>	$3,01 \cdot 10^{-2} \pm 7,59 \cdot 10^{-4}$ <b>M</b>
$\tau_5$ Assoz. Intermediat	$1,66 \pm 9,43 \cdot 10^{-4}$ <b>O</b>	$5,36 \cdot 10^{-2} \pm 5,19 \cdot 10^{-3}$ <b>O</b>	$1,20 \pm 0,11$ <b>O</b>

Die aus den EADS berechneten Absolutspektren der einzelnen Photointermediate sind in Abbildung 34 dargestellt. Es zeigt sich, wie aus den Konturplots zu erwarten war, dass die einzelnen Intermediate sich in ihren spektralen Eigenschaften nicht stark vom WT unterscheiden (Abb. 34B, vgl. Abb. 21B). Das K-Intermediat ist dabei ebenso wie der Dunkelzustand ( $\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$ ) leicht hypsochrom gegenüber dem WT ( $\lambda_{\text{max}} = 563 \text{ nm}$ ) verschoben. Das M-Intermediat ist sowohl in seiner Amplitude als auch in der maximalen Absorption mit dem WT identisch. Unterschiedlich ist die Konfiguration des O-Intermediates. Dieser zeigt in der Mutante keine Abweichung seiner maximalen Absorptionswellenlänge gegenüber dem Dunkelzustand (Abb. 34B). Entsprechend ist die im Konturplot beobachtete geringe O-Akkumulation auch auf die geringen spektralen Unterschieden der beiden Zustände zurückzuführen.



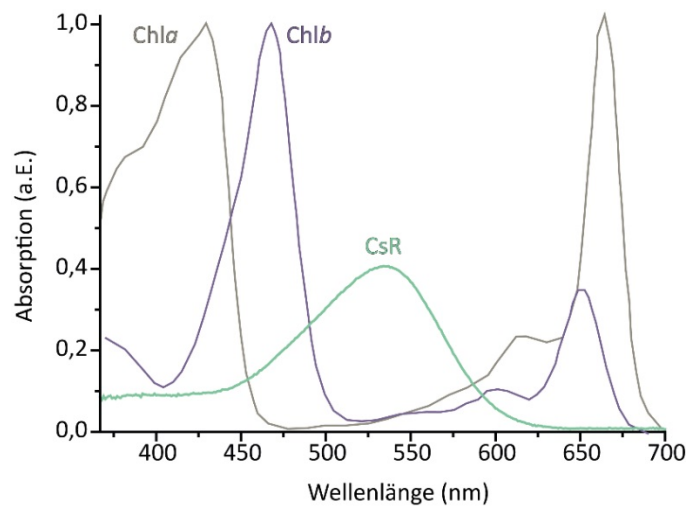
**Abbildung 34** **A** Berechnete EADS von CsR-Tyr14Glu bei pH 7,4. Maximale positive Absorptionsänderung (Licht – Dunkel) der berechneten Photointermediate mit dem jeweiligen Buchstaben gekennzeichnet. SVD-rekonstruierte Daten (Punkte) und geglättete Kurven (Linien) zur besseren Visualisierung, sind gezeigt. **B** Berechnete Absolutspektren der Photointermediate K (grün), M (blau) und O (rot). Das der Berechnung zugrunde liegende Dunkelspektrum (angenommene Anregung 10 %, aller Moleküle) ist in schwarz dargestellt. Wellenlänge der maximalen Absorption für die einzelnen Intermediate angegeben.

## 4 Diskussion

### 4.1 Biologische Relevanz von CsR

Die einzellige nicht-bewegliche Grünalge *Coccomyxa subellipsoidea* wurde 1959/60 aus Algentorf an der Marmorspitze des antarktischen Viktorialandes isoliert (Holm-Hansen, 1964). Wie eingangs erwähnt, war *C. subellipsoidea* der erste auf den Polkappen vorkommende Organismus, dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Dabei wurde festgestellt, dass im Genom von *C. subellipsoidea* keine Photosystem I (PSI)-Reaktionszentrumsuntereinheit N (PsaN) konserviert ist (Blanc *et al.*, 2012). Zwar ist PsaN nicht essentiell für phototropisches Wachstum, jedoch zeigten Studien an *Arabidopsis*, dass das Fehlen der PsaN die Elektronentransferrate von Plastocyanin zu PSI deutlich verlangsamt (Haldrup, Naver and Scheller, 1999). Da kalte Temperaturen einen Exzess an durch das PSI transportierter Elektronen bedingen, wurde der einzigartige Verlust des PsaN-Gens als potentieller Schutzmechanismus interpretiert. Es wurde argumentiert, dass der Überschuss an Elektronen zur Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies führen kann, welcher durch das Fehlen von PsaN abgemindert wird (Blanc *et al.*, 2012). Allerdings wird die Effizienz der Photosynthese bereits durch die kalten klimatischen Bedingungen und das turnusmäßig begrenzte Sonnenlicht in der Antarktis limitiert (Tilzer *et al.*, 1986; Mitchell *et al.*, 2011). Entsprechend hat sich in *C. subellipsoidea* im Laufe der Evolution ein zweiter Reaktionsmechanismus zur Konservierung der Lichtenergie manifestiert. So konnte nicht nur die membranständige Expression der lichtaktivierten Protonenpumpe CsR, sondern auch die Überexpression einer H<sup>+</sup>-ATPase in der Plasmamembran festgestellt werden (Peng *et al.*, 2016; Ranjan and Kateriya, 2018). Dadurch können lichtinduzierte Protonengradienten an der Membran effektiv in ATP umgesetzt werden, wie es unter anderem bereits für Archaea beschrieben wurde (Oesterhelt and Stoeckenius, 1973).

Die Tatsache, dass CsR dabei innerhalb der so genannten „Grünlucke“ der Chlorophylle (Abb. 35) absorbiert und eine nur geringe Abhängigkeit gegenüber dem extrazellulären pH zeigt, macht es im Kontext variierender pH-Milieus der antarktischen Küstenregion zu einem beeindruckenden Beispiel evolutionärer Anpassung (Hofmann *et al.*, 2015; Vogt *et al.*, 2015). Der hohe Verwandtschaftsgrad von CsR mit anderen lichtgetriebenen Pumpen prokaryotischer Herkunft lässt darauf schließen, dass diese Anpassung durch einen horizontalen Gentransfer entstanden ist.



**Abbildung 35** Normierte Absorptionsspektren (arbiträre Einheit) von Chlorophyll a (grau), Chlorophyll b (violett) und CsR (grün). Chlorophyll-Spektren aus (Chen and Blankenship, 2011). Angenommener Absorptionskoeffizient für CsR  $\epsilon = 45000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 4.2 CsR-Photozyklus

Da CsR keine Lichtadaptationsphänomene zeigt (vgl. Abb. 18B), wie sie etwa für BR (Harbison *et al.*, 1984; Hofrichter, Henry and Lozier, 1989) und ChR (Hegemann, Ehlenbeck and Gradmann, 2005; Stehfest and Hegemann, 2010) beschrieben wurden und es weder in dieser Arbeit noch in weiterführender Literatur zusätzliche Messungen zum tatsächlich inkorporierten Isomer gibt, kann zum jetzigen Zeitpunkt ausschließlich auf die Kristallstruktur zurückgegriffen werden, die deutlich eine *all-trans*-Konfiguration des Chromophors vorgibt. Die Vermutung, dass es sich dabei analog zum lichtadaptierten Zustand von BR um das *all-trans*, 15-*anti*-Isomer handelt ist naheliegend, kann jedoch mit den hier erbrachten Daten nicht verifiziert werden. Eine experimentelle Validierung könnte dabei durch Retinal-extraktionsexperimente oder Resonanz-Raman-Messungen erbracht werden. Der in dieser Arbeit vorgestellte Photozyklus des CsR-WT wurde in einem Zeitbereich zwischen 100 ns und 10 s nach Laseranregung untersucht. Dabei wurde ein sequentieller Verlauf beobachtet, der im groben für lichtgetriebene Pumpen vom BR-Typ zu erwarten war. Das erste detektierte Photointermediat in CsR, ist das rotverschobene K-Intermediat, welches bei pH 7,4 bei 570 nm absorbiert (vgl. Abb. 21B). Die Entstehung dieses frühen Intermediates konnte aufgrund der unzureichenden Zeitauflösung ( $\geq 100 \text{ ns}$ ) des Messaufbaus nicht untersucht werden. Tatsächlich zeigen ultra-schnelle UV-vis-Messungen, dass analoge K-Intermediate in anderen mikrobiellen Rhodopsinen bereits in wenigen Picosekunden gebildet werden (Polland *et al.*, 1986; Lutz *et al.*, 2001; Verhoefen *et al.*, 2010). Die bathochrome Verschiebung von K kann in Analogie zu BR auf eine Verdrillung des Chromophores zurückgeführt werden (Nogly *et al.*,

2018), wodurch sich der Abstand der Gegenionen zur RSBH<sup>+</sup> vergrößert und so den hypsochromen Effekt der Gegenionen (Stabilisierung des Grundzustandes) abschwächt. Ob es sich dabei wie bei BR um eine Konfiguration handelt, bei der die C13=C14-Doppelbindung fast vollständig zu *cis* isomerisiert ist, während die C14-C15-Einfach- und die C15=NZ-Doppelbindung noch teilweise gegensätzlich rotiert sind (Schobert *et al.*, 2002), lässt sich ohne schwingungsspektroskopische Studien nicht sagen. Aufgrund der Homologie des Gegenionkomplexes in CsR und BR und dem attestierten elektrostatischen Einfluss der anionischen Gegenionen in BR (Asp85 und Asp212) auf die Photoisomerisierung des Retinals (Logunov, El-Sayed and Lanyi, 1996), liegt die Vermutung nahe, dass diese schnellen Photozyklusprozesse in beiden Proteinen in etwa identisch sind.

Um nun im Folgenden die Dynamiken der einzelnen Photozyklusschritte im Vergleich zu BR diskutieren zu können, sollen die in dieser Arbeit erhobenen Daten mit einem grundlegenden all-*trans*,15-*anti*-Photozyklus von BR verglichen werden, der unter neutralen pH-Bedingungen bei 20°C gemessen und in Heberle *et al.*, 2000 zusammengetragen wurde. Die Zeitkonstante des Zerfalls des K-Intermediates unter neutralen Bedingungen konnte durch die globale Analyse mit etwa 1,8 µs (vgl. Tab. 1) ermittelt werden. Damit ist der initiale Zerfall des K-Intermediates im Vergleich zu BR (~1 µs) langsamer. Weil der Zerfall des K-Intermediates in BR mit ersten strukturellen Änderungen im Proteinerückgrat verbunden ist, können kinetische Unterschiede auf strukturelle Unterschiede zwischen CsR und BR zurückgeführt werden. Da strukturelle Änderungen konzentrisch durch das isomerisierte Retinal propagiert werden, sind vorrangig Reste der Retinalbindetasche an primären strukturellen Änderungen beteiligt. Zeitaufgelöste Röntgenkristallstrukturmessungen an BR zeigen weiterhin, dass mit der Isomerisierung des Retinals eine Bewegung der Lys216-Seitenkette einhergeht, die zu einer schnellen Neuorientierung des mit der RSBH<sup>+</sup> interagierenden Wasser402 führt (Nango *et al.*, 2016; Nogly *et al.*, 2018). Entsprechend modulieren die an der Konfiguration des Gegenionkomplexes beteiligten Reste die Dynamik des K-Zerfalls. Ein wesentlicher Unterschied zwischen CsR und BR besteht hierbei in der bereits vielfach angesprochenen Konfiguration des Arg83, das in direkte Wechselwirkung mit Tyr14 und Glu203 tritt und so im Vergleich zum analogen Arg82 in BR, stärker zum extrazellulären Raum orientiert ist. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der spektroskopischen Analyse der Tyr14Phe-Mutante, die einen beschleunigten K-Zerfall (~1,1 µs, vgl. Tab. 4) zeigt, erlaubt dies die Annahme, dass die durch Tyr14 bedingte rigidere Einbettung von Arg83 zu dem verlangsamten K-Zerfall in CsR beiträgt.

Eine weitere Besonderheit des CsR-Photozyklus zeigt sich im Übergang von K zu M. Dabei ist das für BR beschriebene hypsochrom verschobene L-Intermediat in CsR nicht zu beobachten (vgl. Abb. 20). Röntgenkristallstrukturen des L-Intermediates in BR zeigen eine,

durch die voranschreitende Relaxation des verdrehten 13-*cis*-Isomers bedingte, Verschiebung des Trp182 zu Met145 auf (Kouyama *et al.*, 2004). Da CsR anstelle von Met145 ein Phenylalanin besitzt, kommt es bei einer etwaigen Verschiebung zu größeren sterischen Hinderungen zwischen den beiden Seitenketten, die ein solches L-Intermediat destabilisieren würden. Interessanterweise ist im Photozyklus von Arch-2, das ein zu CsR analoges Phenylalanin besitzt, ebenfalls kein L-Intermediat zu beobachten (Kouyama *et al.*, 2014). Allerdings zeigt das K-Intermediat in Arch-2 mit  $\tau_{K-Arch-2} \sim 40 \mu s$  eine um eine etwa zwanzigfache verlängerte Lebensdauer als das entsprechende Intermediat in CsR ( $\tau_{K-CsR} \sim 1,8 \mu s$ ). Die Autoren argumentierten, dass das L-Intermediat in Arch-2 eine schnellere Zerfallskinetik als K aufweist und deswegen spektroskopisch nicht aufgelöst werden kann (Kouyama *et al.*, 2014). Diese Argumentation erscheint aber in Anbetracht einer sequentiellen Abfolge der Intermediate unlogisch und könnte nur durch eine Verzweigung des Photozykluses nach dem primären Photoprodukt legitimiert werden. Folglich muss auf Grundlage der hier erbrachten Daten für CsR angenommen werden, dass es einen direkten Übergang des K-Intermediates in das M-Intermediat gibt. In diesem Kontext sind Studien an dem rotverschobenen Kanalrhodopsin ReaChR von Interesse. ReaChR zeigt nämlich, anders als ChR2, eine pH-abhängige Akkumulation des L-Intermediates auf (Krause *et al.*, 2017), obwohl beide Kanalrhodopsine ein zu CsR korrespondierendes Phenylalanin in ihrer Retinalbindetasche besitzen. Entsprechend könnten weitere Studien an der Konfiguration der Retinalbindetasche in ReaChR zu einer allgemeineren Beschreibung des L-Intermediates in mikrobiellen Rhodopsinen beitragen.

Der Übergang in das M-Intermediat ist durch die Deprotonierung der Schiff'schen Base gekennzeichnet, die zu der starken hypsochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums führt (Lozier, Bogomolni and Stoeckenius, 1975; vgl. Abb. 20). Dabei wird das Proton der RSBH<sup>+</sup> an den primären Protonenakzeptor Asp86 abgegeben. Für Asp86 wurde im Dunkelzustand ein  $pK_S$ -Wert von  $\sim 2,6$  ermittelt (vgl. Abb. 19B). Folglich muss es durch die Isomerisierung zu einer temporären Anhebung des  $pK_S$ -Wertes von Asp86 kommen, damit es als Protonakzeptor der RSBH<sup>+</sup> ( $pK_{S_{RSBH^+}} \gg pK_{S_{Asp86}}$ ) fungieren kann. Um die Reprotonierung der RSB durch Asp86 zu verhindern und so den unidirektionalen Transport zu erhalten, sind konsekutive Konformationsänderungen notwendig. Kristallstrukturen des M-Intermediates in BR zeigen auf, dass es mit der Protonierung von Asp85 zu einem Umklappen Guanidiniumgruppe des Arg82 hin zum extrazellulären Raum kommt (H. Luecke *et al.*, 1999; Sass *et al.*, 2000; Nango *et al.*, 2016). Dies führt zum Aufbrechen der Glutamatdyade an der extrazellulären Grenzfläche und der Freisetzung des im PRC gebundenen Protons in den extrazellulären Raum. Da der PRC von CsR bereits eine veränderte, BR-M ähnliche, Konfiguration im Dunkelzustand aufweist (vgl. Abb. 14C) sind für CsR identische Änderungen

der extrazellulären Hälfte nicht zu erwarten. Ein Umklappen des Arg83 ist dennoch vorstellbar und wird im folgenden Abschnitt diskutiert. Auf der zytoplasmatischen Seite kommt es ebenfalls zu strukturellen Änderungen, die eine Grundlage für die nachfolgende Reprotonierung der RSB durch Asp97 schaffen (Lettau, 2018). Dieser Mechanismus wird in Abschnitt 4.2.2 näher diskutiert. Bei BR wurden diese großen strukturellen Änderungen mit einer bi- bzw. triphasischen Entstehungskinetik des M-Intermediates korreliert und entsprechende M-Subintermediate definiert (Zimanyi *et al.*, 1992; Cao *et al.*, 1993; Friedman *et al.*, 1994; Chizhov *et al.*, 1996). Auch für CsR zeigt die Trajektorie bei 408 nm eine biphasische Entstehung des M-Intermediates auf (vgl. Abb. 20D). Dabei ist das Amplitudenverhältnis der beiden Komponenten stark pH-abhängig. Während bei pH 9 und pH 7,4 die schnelle Komponente noch ~75% bzw. ~66% der Gesamtamplitude ausmacht, kommt es bei pH 5 zu einer Umkehrung des Verhältnisses und die Kinetik wird mit ~66% durch die langsamere Zeitkonstante diktiert. Die verlangsamte initiale Deprotonierung der RSBH<sup>+</sup> bei pH 5 könnte durch eine Kopplung des PRC mit Asp86 erklärt werden, die eine Protonierung des Gegenions im sauren Milieu erschwert. Der biphasische Kurvenverlauf lässt wie bei BR auch darauf schließen, dass es im Verlauf der Deprotonierung zu weiteren Konformationsänderungen im Protein kommt, die zur vollständigen Deprotonierung der RSB beitragen. Ob es sich wie bei BR um drei Subintermediate ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_2'$ , Balashov, 2000) handelt, lässt sich mit den hier erhobenen Daten nicht beantworten, da es zwischen den Subintermediaten zu Übergängen kommen kann, die absorptionsspektroskopisch nicht unterscheidbar sind. Zur Klärung bedarf es demnach anderer spektroskopischer Methoden wie etwa der FTIR-Differenzspektroskopie. Gegenwärtig wird aufgrund des kinetischen Verlaufes von zwei M-Subintermediaten ausgegangen.

Die nachfolgende Reprotonierung der RSB kann durch den Zerfall des M-Intermediates beschrieben werden. Dabei zeigt CsR auch hier eine biphasische, pH-abhängige Kinetik auf. Unter sauren Bedingungen wird die Reprotonierung beschleunigt, während ein alkalisches Milieu die Reprotonierung verlangsamt (vgl. Abb. 20B, D, F). Da es sich bei der Reprotonierung der RSB um einen passiven Prozess handelt, in dem das Proton durch einen transienten Wasserkanal von Asp97 auf die RSB übertragen wird, kann die verlangsamte Reprotonierung, in Analogie zu BR, darauf zurückgeführt werden, dass bei pH 9 der  $pK_s$ -Wert der RSB im  $M \rightleftharpoons N$  Gleichgewicht ( $pK_{SM \rightleftharpoons N-RSB} \sim 8$ , Brown and Lanyi, 1996) überschritten und so die Protonierung der selbigen behindert wird. Der Analogie folgend müsste bei pH 5 die Deprotonierung von Asp97 in CsR ( $pK_{SM \rightleftharpoons N-Asp96} \sim 7-7,5$  in BR, Balashov, 2000) gestört werden, was den konventionellen Weg der Reprotonierung behindert. Mögliche Ursachen für die gegensätzliche bei CsR beobachtete deutlich beschleunigte Reprotonierung der RSB in saurem Milieu, werden in Abschnitt 4.2.2 diskutiert. Bei BR zeigt das reprotonierte N-Intermediat eine

hypsochrome Schulter, sonst aber eine hohe spektrale Überlappung mit dem Dunkelzustand auf, wobei der molare Absorptionskoeffizient gegenüber dem Dunkelzustand erniedrig scheint (Drachev *et al.*, 1987; Balashov *et al.*, 1990). Ein solcher Zustand konnte in den Differenzspektren von CsR-WT nicht beobachtet werden. Da der Zerfall des M-Intermediates unter neutralen Bedingungen mit dem für BR bestimmten Kinetiken vergleichbar ist ( $\tau_{M-BR} \sim 3$  ms), ist es vorstellbar, dass der N $\rightarrow$ O-Übergang in CsR beschleunigt ist, sodass dieser durch die große spektrale Verschiebung der Deprotonierung überdeckt und dadurch im Absorptionsdifferenzspektrum nicht identifiziert werden kann. Der biphasische Zerfall des M-Intermediates ist damit durchaus vereinbar. Da das N-Intermediat in Analogie zu BR durch ein protoniertes 13-*cis*-Isomer des Retinals und dem anionischen Protonendonator Asp97 definiert wird, sollte eine eindeutige Identifizierung des N sowohl in FTIR-, als auch in Resonanz-Raman-Messungen möglich sein. Entsprechend könnte durch ergänzende zeitaufgelöste FTIR- und Resonanz-Raman-Messungen die tatsächliche Kinetik des N $\rightarrow$ O Überganges für CsR bestimmt werden. Die Messungen an CsR-Ala56His und Arg83Gln zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, protonierte 13-*cis*-Intermediate durch zeitaufgelöste Absorptionsdifferenzmessungen zu identifizieren. Allerdings kann hierbei die Zuweisung nur indirekt über Literaturvergleiche erfolgen, was eine hohe Homologie zum referenzierten Protein voraussetzt. Tatsächlich zeigen die berechneten Intermediatsspektren des potentiellen N-Intermediates eine Übereinstimmung zu dem für BR beschriebenen N-Spektrum (Drachev *et al.*, 1987). Die Photozyklen der beiden angesprochenen Mutanten werden im Kontext passiver Protonenleitung in Abschnitt 4.3 besprochen.

Das Letzte für CsR beobachtete Photozyklusintermediat ist das im Vergleich zum Dunkelzustand bathochrom verschobene O-Intermediat (auch als P480 bei ChR2 bezeichnet, Stehfest and Hegemann, 2010). In BR unterscheidet sich das O-Intermediat von N durch ein reprotoniertes Asp97 und das dann fast vollständig relaxierte all-*trans*-Retinal (Smith *et al.*, 1983; Braiman *et al.*, 1988), wobei der primäre Protonakzeptor unter neutralen Bedingungen noch protoniert vorliegt. Das O-Intermediat in CsR ist, im Vergleich zu BR, außergewöhnlich langlebig. Unter neutralen Bedingungen wurde für den Übergang von O in den Dunkelzustand eine Zeitkonstante von 233 ms bestimmt (vgl. Tab. 1), was eine etwa 8-fache Verlangsamung dieses letzten Photozyklusschrittes gegenüber BR oder AR-2 und eine etwa 3-fache Verlangsamung gegenüber AR-1 bedeutet (Furuse *et al.*, 2015; Heberle *et al.*, 2000; Kikukawa *et al.*, 2011). Studien an der BR-Mutante Leu93Ala, die eine etwa 200-fach verlangsamte Abklingkinetik des O-Intermediates zeigt, verdeutlichen dabei den Einfluss einzelner hydrophober Reste der zytoplasmatischen Seite auf die Dynamik der späten Photozyklusprozesse (Tóth-Boconádi, Keszthelyi and Stoeckenius, 2003). Der Einfluss ausgewählter Reste des zytoplasmatischen Halbkanals auf die Dynamik der Reprotonierung in

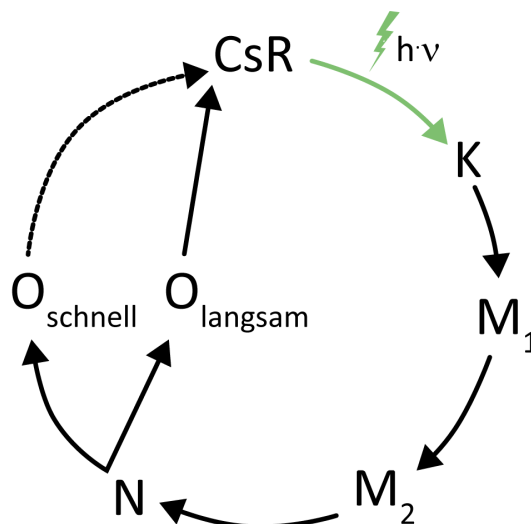


CsR, wird in Abs. 4.2.2 thematisiert. Weiterhin ist die Akkumulation des O-Intermediates in CsR stark pH-abhängig. Dabei sind die beiden pH-abhängigen Prozesse, die für die Lebensdauer von O mitbestimmend sind, die Deprotonierung des Asp86, sowie die Reprotonierung des Asp97. Dass bei pH 9 die Akkumulation des O-Intermediates vernachlässigbar klein ist (vgl. Abb. 20E), wurde bereits mit einer verfrühten Deprotonierung des primären Protonakzeptors Asp86 legitimiert (vgl. Abs. 3.3.1.3). Eine weitere Erklärung könnte eine verlangsamte Reprotonierung des Asp97 im N→O-Übergang sein, wie sie auch für BR beschrieben wurde (Fodor *et al.*, 1988; Balashov *et al.*, 1999). Bei pH 5 konnte der Zerfall des O-Intermediates in der globalen Analyse nur durch zwei kinetische Komponenten angenähert werden, die auf eine Heterogenität dieses Zustandes hindeutet. Interessanterweise wurde in einer Studie an AR-2 unter sauren Bedingungen ( $\leq$  pH 5,5) eine ähnliche Heterogenität im O-Intermediat festgestellt (Tamogami *et al.*, 2017). Die Autoren argumentierten, dass es sich dabei um zwei O-Subintermediate handelt, die sich in der Konfiguration des Chromophores unterscheiden. Demnach soll es im N→O-Übergang zunächst zu einer 13-*cis*, 15-*syn*-Isomerisierung kommen, auf die das initiale all-*trans*,15-*anti*-Isomer folgt. Der N-H-Dipol der reprotonierten Schiff'schen Base kann im 13-*cis*, 15-*syn*-Isomer durch das anionische Gegenion Asp212 stabilisiert werden, wie MD-Simulation an BR von Wang *et al.* demonstrieren (Wang, Facciotti and Duan, 2013). Ob ein analoger Mechanismus auch bei CsR möglich ist, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Da diese Heterogenität allerdings besonders bei pH 5 ausgeprägt scheint und somit mit einem beschleunigten M→O-Übergang zusammenhängen kann, ist die Vermutung einer veränderten Reiseromerisierungskaskade, aufgrund der beschleunigten Reprotonierung der RSB durchaus zulässig. Zusätzlich soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass die bathochrome Verschiebung des O-Intermediates in CsR deutlich geringer ausfällt als bei BR. Das O-Intermediat in BR ist gegenüber dem Dunkelzustand um etwa 70 nm zu 640 nm bathochrom verschoben (Zimányi, Keszthelyi and Lanyi, 1989). Hingegen zeigt O in CsR seine maximale Absorption nur um wenige Nanometer gegenüber dem Dunkelzustand rotverschoben, wobei das maximale Differenzsignal durch die rote absorptive Schulter des O-Intermediates entsteht (vgl. Abb. 21B). Des Weiteren ist der Unterschied der O-Absorption etwa geringer als der Unterschied des K-Intermediates gegenüber dem Dunkelzustand (vgl. Abb. 21B). Dieser Befund lässt auf eine verringerte Planarität, also eine erhöhte Verdrillung des Isomeres im O- als im K-Intermediat schließen, was wiederum einen deutlichen Unterschied zu BR ausmacht und so auf weitere Unterschiede im Reiseromerisierungsmechanismus von CsR hindeutet, die durch schwingungsspektroskopische Untersuchungen adressiert werden könnten.

Damit einhergehend muss konstatiert werden, dass der langsame Zerfall des O-Intermediates nicht mit den großen Pumpströmen von CsR vereinbar ist. Da eine Rückkehr in

den Dunkelzustand die Bedingung für die Reaktivierung des Pumpprozesses darstellt, müsste unter der Annahme, dass die Wiederherstellung des Dunkelzustandes ausschließlich durch den mit  $\tau \sim 233$  ms (pH 7,4) ermittelten Zerfall des O-Intermediates realisiert wird, der stationäre Photostrom unter Dauerlicht drastisch absinken, da dabei das langlebige O-Intermediat akkumuliert wird. Weil ein solcher Abfall des Stromes jedoch nicht beobachtet werden kann (vgl. Abb. 31A), muss von einem Seitenweg innerhalb des Photozyklus ausgegangen werden, der die Restauration des Dunkelzustandes beschleunigt. Tatsächlich zeigt der Fit der isolierten Trajektorie bei 605 nm (vgl. Abb. 20D) im Zeitbereich von 4 ms bis 10 s, was den Zerfall des O-Intermediates repräsentiert, bereits bei pH 7,4 eine biphasische Kinetik mit einer schnellen ( $\sim 10$  ms) und der oben beschriebenen langsamen ( $\sim 230$  ms) Komponente auf. Dass eine solche Kinetik nicht durch die globale Analyse rekonstruiert werden konnte, kann teilweise auf den signifikant kleineren Amplitudenanteil der schnellen Komponente ( $\sim 10\%$ ) zurückgeführt werden. Nichtsdestotrotz würde ein zusätzlicher schneller Übergang vom O-Intermediat in den Dunkelzustand eine Möglichkeit darstellen, um die spektroskopischen mit den elektrophysiologischen Befunden zu vereinbaren.

Eine schematische Zusammenfassung des diskutierten Photozyklus von CsR ist in Abbildung 36 gegeben.



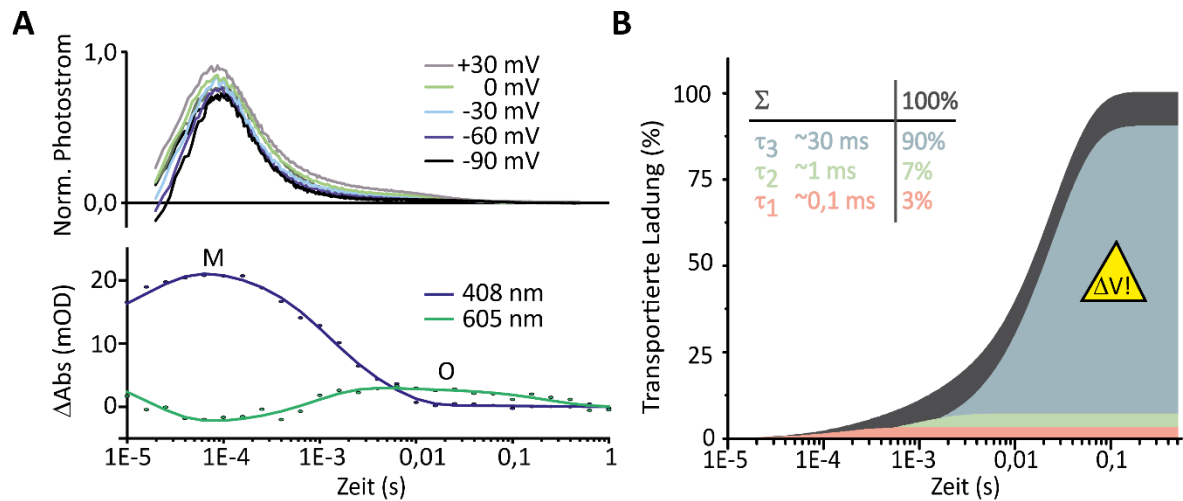
**Abbildung 36** Schematischer Photozyklus von CsR unter neutralen Bedingungen. Der grüne Blitz symbolisiert die lichtinduzierte Initiierung des Photozykluses während alle weiteren Übergänge thermisch erfolgen. Die einzelnen Photointermediate sind in Analogie zu BR benannt und wurden in der globalen Analyse teilweise durch Mischzustände zweier Photointermediate repräsentiert. Die Aufspaltung des O-Intermediates in zwei Subintermediate mit verschiedenen Zerfallskinetiken konnte nicht in der globalen Analyse rekonstruiert werden.

### 4.2.1 Einfluss des PRC auf Protonentransferschritte in CsR

Die exakte Zusammensetzung und Konfiguration des PRC kann sich in den einzelnen Pumpen vom BR-Typ stark unterscheiden. Im Fall von CsR vereint der PRC Merkmale verschiedener lichtgetriebener Protonenpumpen (vgl. Abb. 14D). Deswegen sollen Eigenschaften des PRC in diesem Abschnitt im Hinblick auf die Protonenfreisetzung sowie die späte Deprotonierung von Asp86, vor allem durch den Vergleich mit BR, AR-1 und AR-2, diskutiert werden.

In BR kommt es mit der Protonierung des primären Protonakzeptors Asp85 zu einem Umklappen des Arg82, was in der Folge den  $pK_s$ -Wert des PRC drastisch erniedrigt. Doch bereits im Dunkelzustand ist eine Kopplung zwischen dem PRC und Asp85 vorhanden, die die Protonenaffinität des primären Protonakzeptors durch den Protonierungsgrad und die Konformation des PRC moduliert und so die Titration von Asp85 durch den extrazellulären pH ermöglicht (Balashov, 2000). In Anbetracht der dargelegten pH-Titration von CsR (vgl. Abb. 19), muss auch hier von einer ähnlichen Abhängigkeit ausgegangen werden. Auch in AR-1, wo das analoge Arginin bereits im Dunkelzustand zur EZ Seite orientiert ist, liegt eine solche Kopplung vor (K. A. Lee *et al.*, 2015). Das ist besonders im Zusammenhang mit Untersuchungen an ESR interessant, da dort eine etwaige Kopplung aufgrund einer ähnlichen Konfiguration des Arginins ausgeschlossen wurde (Gushchin *et al.*, 2013). Entsprechend kann die Kopplung zwischen PRC und Gegenionkomplex in lichtgetriebenen Pumpen nicht ausschließlich durch das zentrale Arginin aufrechterhalten werden. Folgerichtig zeigten Untersuchungen an BR, dass Mutationen der beiden Glutaminsäurereste nahe der extrazellulären Oberfläche (Glu194 und Glu204) zu Glutamin ebenfalls die Kopplung aufheben und mit einer Verzögerung der Protonenabgabe einhergehen (Brown *et al.*, 1995; Richter, Brown, *et al.*, 1996; Balashov *et al.*, 1997), die im WT unter neutralen Bedingungen unmittelbar nach der Deprotonierung der RSB erfolgt (Grzesiek and Dencher, 1986). Dabei wird angenommen, dass es durch eine Protonierung von Glu204 zum Aufbrechen der H-Brücke zwischen Ser193 und Glu204 kommt, wodurch die Protonenfreisetzung bewirkt wird (Gerwert, Freier and Wolf, 2014). Konsistent wurde für AR-1 argumentiert, dass die beobachtete spätere Protonenfreisetzung durch eine erschwerte Protonierung des zu Glu204 analogen Glu199 zustande kommt, die in der hydrophileren Umgebung dieses Restes begründet liegt (Furuse *et al.*, 2015). Auch in CsR unterscheidet sich die Konfiguration des analogen Glu203 stark von BR. Glu203 steht in direkter Wechselwirkung zu Arg77, Arg83 und zwei komplexierten Wassermolekülen (vgl. Abb. 14A). Dementsprechend muss auch für CsR im Dunkelzustand von einem geringeren  $pK_s$ -Wert des Glu203 ausgegangen werden als es in BR der Fall ist. Allerdings besitzt CsR auch das zweite Glu193 (vgl. Abb. 14A), das in AR-1 nicht vorhanden ist und ebenfalls das freizusetzende Proton lokalisieren kann (Gerwert, Freier and Wolf, 2014). Somit ist die Konsequenz des

abgesenkten  $pK_s$ -Wertes schwer mit der für AR-1 hervorgebrachten Schlussfolgerung vergleichbar. Folglich ist die Frage, ob es tatsächlich zu einer verspäteten Protonenabgabe, wie im Fall von AR-1 kommt, mit der gegenwärtigen Datenlage nicht eindeutig zu beantworten. Weiterführende blitzlichtinduzierte elektrische Messungen von CsR in HEK293-Zellen (Messungen und Analysen durchgeführt von Johannes Vierock, Humboldt-Universität zu Berlin) zeigten zwar unter symmetrischen Bedingungen (150 mM NaCl, pH 7,2) einen transienten auswärtsgerichteten Verschiebungsstrom, der mit der Formation des M-Intermediates korrelierte (Abb. 37A), allerdings wurde ein solcher kurzer auswärtsgerichteter Strom auch in dem Kanalrhodopsin *GtCCR2* nachgewiesen, wo es zu keiner extrazellulären Protonenabgabe kommt (Sineshchekov *et al.*, 2017). Entsprechend wurde für *GtCCR2* der initiale auswärtsgerichtete Strom dem Protonentransfer der RSB zu dem primären Protonakzeptor zugewiesen. Für CsR erlaubte die weitergehende Analyse des Integrals der Stromtrajektorie den Anteil der kinetischen Komponenten am Gesamtstrom zu ermitteln (Abb. 37B). Dabei zeigte sich, dass der Gesamtstrom durch drei kinetische Komponenten beschrieben wird. Die erste Komponente ( $\tau_1 \sim 0,1$  ms) kann analog zu *GtCCR2* dem Protonentransfer von der RSB auf Asp86 zugeschrieben werden und repräsentiert lediglich 3 % der transportierten Ladung. Die Zuordnung der zweiten Komponente ( $\tau_2 \sim 1$  ms) ist indes nicht trivial, da es mit der Deprotonierung der RSB zu großen Konformationsänderungen kommt, die durch gerichtete Bewegungen geladener Seitenketten einen Strom darstellen. In Anbetracht dessen, lässt sich nicht sagen, ob die mit dieser Komponente assoziierten 7 % der transportierten Ladung auch eine mögliche Freisetzung eines Protons in den extrazellulären Raum beinhalten. 90 % der Ladung wird in einem Zeitbereich transportiert, der mit dem O-Intermediat korreliert. Interessanterweise zeigt eben diese Komponente eine starke Spannungsabhängigkeit auf, die zu einer starken Verlangsamung bei negativen Haltespannungen führt. Da weiterhin unter Dauerlicht die mit dieser Stromkomponente assoziierten späten Photozyklusintermediate akkumuliert werden, ist diese Stromkomponente für die vorhergehend beobachtete hohe Spannungsabhängigkeit von CsR (vgl. Abb. 31) verantwortlich. Die Spannungsabhängigkeit von CsR ist somit eine spannungsabhängige Modulation der Photozykluskinetiken. Der große Anteil dieser Komponente am Gesamtstrom ist durch die umfangreichen Protonentransferschritte in diesem Zeitbereich zu erklären. Zum einen kommt es zur Reprotonierung der RSB aus dem zytoplasmatischen Raum (Gegenstand des folgenden Abschnittes) und zum anderen findet die Deprotonierung des primären Protonakzeptors Asp86 zum PRC statt. Eine weitere Beteiligung der möglichen Protonenabgabe an das EZ Medium kann hierbei ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 37 A Oben:** Normierte blitzlichtinduzierte Photoströme von CsR-WT bei verschiedenen Haltespannungen, aufgenommen und ausgewertet durch Johannes Vierock mittels Patch-Clamp-Messungen an HEK293-Zellen bei symmetrischen Bedingungen (pH 7,2, 150 mM NaCl). **Unten:** Kinetischer Verlauf der für M und O repräsentativen Trajektorien von aufgereinigtem CsR-WT bei pH 7,4. Extrahiert aus Abb. 20. **B** Prozentuale Anteile der einzelnen kinetischen Komponenten am Gesamtstrom über die Zeit, berechnet aus dem Kurvenintegral des blitzlichtinduzierten Photostromes bei 0 mV. Lediglich  $\tau_3$  zeigte bei weitergehenden Untersuchungen eine Spannungsabhängigkeit (Warnsymbol) der Geschwindigkeit auf.

Die Deprotonierung von Asp86 und somit die Wiederherstellung des Dunkelzustandes wird maßgeblich durch den Protonierungsgrad des PRC reguliert (Balashov *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000). Unter der Voraussetzung, dass die effiziente Reprotonierung der RSB gewährleistet ist (positive Haltespannung oder niedriger intrazellulärer pH), stellt dieser letzte Protonentransfer den geschwindigkeitslimitierenden Schritt dar. Folgerichtig ist zu erwarten, dass eine beschleunigte Deprotonierung des PRC auch zu einer schnelleren Deprotonierung des Asp86 führt. Gleichbedeutend muss es bei einer Unterschreitung des  $pK_S$ -Wertes vom PRC unter Lichtsättigung zu erhöhten Stromamplituden kommen, da mit der Beschleunigung der Deprotonierung von Asp86 auch die Anzahl der Photozyklusdurchläufe in einem gegebenen Zeitintervall steigt. Die Tatsache, dass die Photoströme von CsR erst bei einem äußeren pH von 10 leicht erhöht sind, lässt darauf schließen, dass der  $pK_S$ -Wert des PRC bei  $> 7,5$  liegt (Vogt *et al.*, 2015). Insbesondere wird dies an der Thr46Asn-Mutante deutlich, die eine verringerte Spannungsabhängigkeit der RSB-Reprotonierung aufweist (Vogt, 2017), wodurch der letzte Photozyklusschritt an Bedeutung für den Gesamtumsatz des Photozykluses gewinnt. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen aus den spektroskopischen Experimenten überein, bei denen gezeigt werden konnte, dass es bei pH 7,4 noch zu einer signifikanten Akkumulation des O-Intermediates kommt, während diese bei pH 9 nur noch sehr gering vorhanden ist (vgl. Abb. 33). Damit liegt der  $pK_S$ -Wert des PRC in CsR deutlich über den für BR berichteten Werten von 5,8 im M- und 4,3 im O-Intermediat (Balashov *et al.*, 1999). Der Grund hierfür könnte in den verschiedenen Konfigurationen der PRCe beider Pumpen liegen (vgl. Abs. 3.2.2.2). Insbesondere spielt dabei die Salzbrücke zwischen Glu203 und Arg77 eine entscheidende Rolle

(vgl. Abb. 14A). Unter der Annahme, dass es sich analog zu BR, bei Glu203 um die finale Gruppe der Protonenfreisetzung handelt (Brown *et al.*, 1995), wird diese durch elektrostatische Kopplung mit Arg77 moduliert. Damit übereinstimmend, konnten in Untersuchungen an AR-1 und -2, wo diese Glu-Arg-Wechselwirkung ebenfalls vorliegt, vergleichbar hohe  $pK_S$ -Werte bestimmt werden (Tsunoda *et al.*, 2006; Hagedorn, Gradmann and Hegemann, 2008; Kikukawa *et al.*, 2011; Furuse *et al.*, 2015). Im Fall von AR-2 wurde für AR2-Glu199 ein  $pK_S$ -Wert von  $\sim 8,4$  ermittelt, während die Protonenabgabe bei  $pH > 10$  einem unbekannten Rest mit einem  $pK_S$ -Wert von  $\sim 10,5$  zugeschrieben wurde. Vieles spricht dafür, dass es sich bei diesem Rest um das Arg72 (Arg77 in CsR) handelt. Interessanterweise zeigen sowohl die Mutante Glu203Gln als auch Arg77Gln eine signifikante Zunahme der Stromamplituden im Übergang von  $pH\ 5$  zu  $pH\ 7,5$  (Vogt *et al.*, 2015; Daten zu Arg77Gln aus privater Mitteilung von Dr. Arend Vogt, nicht gezeigt), was im Sinne der vorhergehenden Argumentation mit einer Verringerung des  $pK_S$ -Wertes der Protonenabgabe einhergeht. Auch in den spektroskopischen Experimenten ist zu sehen, dass bei Arg77Gln bereits bei  $pH\ 8$  die Akkumulation des O-Intermediates vernachlässigbar klein ist (vgl. Abb. 25A,E).

Weiterhin ist das O-Intermediat in CsR-Arg77Gln bei  $pH\ 5$  im Vergleich zum WT weniger stark ausgeprägt, was in Übereinstimmung mit einer verstärkten Anreicherung an M-Intermediat ist (vgl. Abb. 25B,F). Dass es zu einer solch starken Akkumulation an M-Intermediat kommt, kann wiederum auf die Kopplung zwischen Asp86 und Glu203 zurückgeführt werden. Dabei erfüllt für BR die Kopplung zwischen den beiden Resten die Regel, dass unter neutralen  $pH$ -Bedingungen nur einer der beiden Reste, nicht jedoch beide Reste anionisch sein können (Richter, Brown, *et al.*, 1996). Kommt es nun zu einer Deprotonierung des Glu203, ist dies mit einem Anstieg des  $pK_S$ -Wertes von Asp86 verbunden, was das Quasi-Equilibrium mit der RSB zum vollständigen Protonentransfer verschiebt. Unter der Annahme, dass in CsR-Arg77Gln die hydrophile Umgebung von Glu203 fortbesteht, kann es dazu kommen, dass Glu203 bereits bei  $pH\ 5$  deprotoniert. Das würde, wie eben dargelegt, die Deprotonierung der RSB begünstigen und so die starke Akkumulation des M-Intermediates erklären, die sich tatsächlich vor allem in einem Anstieg der schnellen Zeitkomponente in der Entstehung des M-Intermediates äußert. Einschränkend muss konzidiert werden, dass es durch die Substitution des Arginins durch ein Glutamin höchstwahrscheinlich zu weitreichenderen konformationellen Änderungen dieses hochkomplexen Wasserstoffbrückennetzwerkes kommt, die sich unter anderem in der hypsochromen Verschiebung des Dunkelzustandes äußern (vgl. Abb. 24B). Entsprechend sind sekundäre Effekte der Proteinkonfiguration zu erwarten, die aufgrund der begrenzten Datenlage, in der Betrachtung außer Acht gelassen werden müssen. Umso schwerer ist die bei  $pH\ 8$  beobachtete hypsochrome Verschiebung des deprotonierten M-Intermediates, die durch eine Aufspaltung

in zwei M-Subpopulationen beschrieben wurde (vgl. Abs. 3.3.3) nachzuvollziehen. Interessanterweise wurde bei der einwärtsgerichteten Protonenpumpe NsXeR ebenfalls eine spektrale Aufspaltung des M-Intermediates festgestellt, wobei es zu einer bathochromen Verschiebung des zweiten M-Subintermediates von 378 nm zu 404 nm kam (Shevchenko *et al.*, 2017). Leider legten die Autoren keine weitergehende Erläuterung dieses Befundes dar. In dem bistabilen HKR1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurden zwei verschiedene deprotonierte UV-Spezies identifiziert, bei denen Unterschiede in der Absorption auf verschiedenartige Retinalisomere zurückgeführt wurden (Luck and Hegemann, 2017). Demnach besitzt der UV-Zustand mit einer maximalen Absorption bei 380 nm das 13-*cis*,15-*anti*-Retinalisomer, während der zweite UV-Zustand mit einer maximalen Absorption bei 395 nm ein 13-*trans*,15-*syn*-Isomer inkorporiert. Würde man auf Grundlage dieser Befunde ein Photozyklusmodell für CsR-Arg77Gln postulieren, müsste in der Mutante die Deprotonierung der RSBH<sup>+</sup> der *trans-cis*-Isomerisierung des Retinals vorangehen. Tatsächlich könnte die relative Position der Gegenionen zur Polyenkette, die die Höhe der Barriere zur Isomerisierung bestimmt (Tavan, Schulten and Oesterhelt, 1985) in Arg77Gln verändert sein, was durch die hypsochrome Verschiebung des Grundzustandes impliziert wird (vgl. Abb. 24B). Auch das berechnete Absolutspektrum des K-Intermediates zeigt eine deutliche hypsochrome Verschiebung gegenüber dem K-Intermediat des WT auf (vgl. Abb. 25C), was entweder durch eine verstärkte Verdrillung des Chromophores und somit einer verringerten Planarität der Polyenkette, oder eines stärkeren hypsochromen Einflusses der Gegenionen auf die RSBH<sup>+</sup> erklärt werden könnte. Konsistent mit den unterschiedlichen Extinktionen der M-Subintermediate in Arg77Gln (vgl. Abb. 25E) wurde für ein 13-*cis*-*n*-Butylamin-Retyniliden mit deprotonierter Schiff'scher Base eine gegenüber dem all-*trans*-Isomer verschobene Absorption zu kurzwelligerem Licht und ein verringerter Extinktionskoeffizient festgestellt (Freedman and Becker, 1986). Inwieweit ein solcher Mechanismus realisierbar ist, kann mit der gegenwärtigen Datenlage nicht beantwortet werden. Alternativ wurde durch MD-Simulationen für BR eine 13,*cis*-15,*syn/anti*-Isomerisierung um die C15=N Doppelbindung als ein der Reprotonierung vorgeschobener RSB-Schalter postuliert (Wang, Facciotti and Duan, 2013). Ob jedoch eine C=N-Isomerisierung alleine für die deutliche spektrale Verschiebung verantwortlich sein kann, ist fraglich. Eine so große hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums wurde in BR nur über einen Seitenweg des Photozykluses erreicht, bei dem es durch erneute Belichtung des O-Intermediates zu einer 9-*cis*-Isomerisierung des Retinals kam, welches in der Folge zur Hydrolyse des Chromophors führte und so die Absorption in den UV-Bereich verschob (Popp *et al.*, 1993; Tallent *et al.*, 1998). Durch die thermische Reisoomerisierung zu all-*trans* kam es letztlich zu der Wiederausbildung der RSB. Dass ein solcher 9-*cis*-Zustand innerhalb des kurzen Zeitbereiches im sonst konventionellen

Photozyklus der Mutante ausgebildet wird, ist hingegen hochgradig unwahrscheinlich. Dementsprechend muss eingestanden werden, dass ohne weiterführende Experimente zu CsR-Arg77Gln keine eindeutige Erklärung für die Aufspaltung des M-Intermediates gegeben werden kann. Die Tatsache, dass diese Aufspaltung bei pH 5 nicht auftritt, deutet jedoch auf ein meta-stabiles Equilibrium zwischen M<sub>370</sub> und N hin, welches aufgrund der beschleunigten Reprotonierung in saurem Milieu nicht auftritt.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die geringe pH-Abhängigkeit des Photostromes in CsR auf die besondere Konfiguration des PRC zurückgeführt werden könnte. Dabei bildet die Arg77-Glu203-Wechselwirkung eine Abschirmung gegenüber Einflüssen des extrazellulären pH aus. Der hohe  $pK_S$ -Wert dieser Wechselwirkung trägt maßgeblich zu der außerordentlich langen Lebensdauer des O-Intermediates bei und stellt unter positiven Haltespannungen den Geschwindigkeitslimitierenden Schritt des Photozykluses dar. Gleichzeitig verdeutlichen die Beobachtungen an CsR-Arg77Gln, dass Mutationen am hochgradig verflochtenen PRC zu sekundären Effekten führen können, die die mechanistische Betrachtung einzelner Punktmutationen erschwert. Umso wichtiger ist es verschiedene experimentelle Methoden zusammenzubringen, um generalisierte Aussagen über den Einfluss einzelner Substitutionen zu ermöglichen. Infolgedessen sollten in einem nächsten Schritt zunächst die CsR-Mutanten Glu193Gln und Glu203Gln auch in Kombination mit Arg77Gln spektroskopisch charakterisiert werden. Bis dahin sollten direkte Vergleiche dieser Substitutionen zwischen CsR und BR nur unter Vorbehalt getroffen werden. Letztlich stellt der besondere Photozyklus von CsR-Arg77Gln ein interessantes Forschungsobjekt dar, den es durch weitergehende Studien zu verstehen gilt.

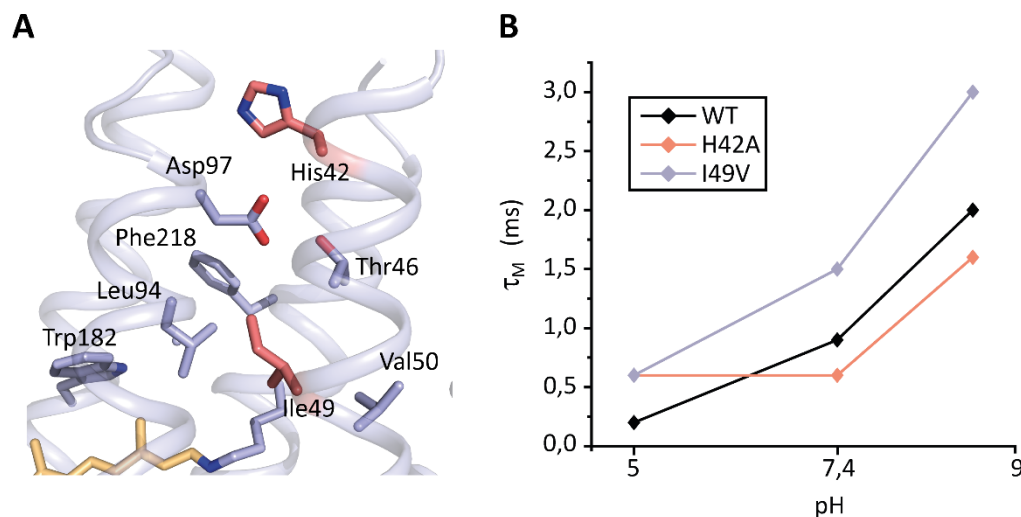
### 4.2.2 Protonentransferprozesse in der zytoplasmatischen Hälfte von CsR

Der grundlegende Mechanismus der Reprotonierung der RSB ist in allen Pumpen vom BR-Typ konserviert (Brown, 2014). Durch konformationelle Änderungen im zytoplasmatischen Teil des Proteins kommt es in der sonst stark hydrophoben Kavität zur Ausbildung eines transienten Wasserkanals, der den Protonentransport von einem konservierten Aspartat zur RSB ermöglicht. Somit stellt die Reprotonierung einen passiven Diffusionsprozess dar und ist dementsprechend stark vom elektrischen Feld abhängig. Weiterhin muss während der Ausbildung des zytoplasmatischen Halbkanals der Zugang zum zytoplasmatischen Medium verschlossen bleiben, um einen möglichen Protonenrückfluss zu verhindern. Überdies wird in



einem letzten Schritt die effiziente Reprotonierung des Protonendonors aus dem zytoplasmatischen Medium sichergestellt, um das Protein funktional zu erhalten (vgl. Abs. 1.3.1.1). Da CsR eine deutlich erhöhte Spannungsabhängigkeit gegenüber anderen Protonenpumpen vom BR-Typ aufweist, sollen in diesem Abschnitt ausgewählte, mit dem zytoplasmatischen Halbkanal assoziierte Reste des CsR diskutiert werden. Dabei werden Ergebnisse aus der Zusammenarbeit mit Elisabeth Lettau vorgestellt, die im Rahmen ihrer Masterarbeit „Untersuchung des Protonenaufnahmemechanismus der lichtaktivierten Pumpe CsR“ (Lettau, 2018), spektroskopische Untersuchungen an Mutanten des CsR mit verschiedenartigen Kompositionen des zytoplasmatischen Halbkanals durchführte.

Die Geschwindigkeit des Protonentransfers ist in Abwesenheit eines Membranpotentials abhängig von der Differenz der  $pK_s$ -Werte von Donor und Akzeptor (Decoursey, 2003). Somit können durch den Vergleich der Geschwindigkeiten der RSB-Reprotonierung im WT und den einzelnen Mutanten, Rückschlüsse zum Einfluss einzelner Reste auf die elektrostatische Konfiguration des Asp97 und der RSB getroffen werden. Untersuchungen an anderen lichtgetriebenen Protonenpumpen zeigten bereits auf, dass die Geschwindigkeit der Reprotonierung der RSB mit der schnellen kinetischen Komponente des Zerfalls des M-Intermediates korreliert werden kann (Balashov *et al.*, 1999; Kikukawa *et al.*, 2011; Furuse *et al.*, 2015). Die ermittelten Zeitkonstanten dieser Komponente bei pH 5, 7,4 und 9, sind für die jeweiligen Mutanten und den WT in Abbildung 38B dargestellt.



**Abbildung 38** **A** Detailansicht einiger an der Ausbildung des zytoplasmatischen Halbkanals involvierten Reste. Die näher diskutierten Reste His42 und Ile49 sind in rot dargestellt. **B** Auswertung der aus der globalen Analyse bestimmten schnellen Zeitkonstanten des M-Zerfalls für WT (schwarz), His42Ala (rot) und Ile49Val (blau), bei pH 5, pH 7,4 und pH 9. Daten für His42Ala und Ile49Val wurden in Zusammenarbeit mit Elisabeth Lettau erhoben. Verbindungslinien zwischen den einzelnen Datenpunkten geben vereinfachte Darstellungen für den erwarteten Verlauf an und wurden nicht experimentell bestimmt.

Der WT zeigt eine Verlangsamung der Reprotonierung sowohl beim Übergang von pH 5 zu pH 7,4, als auch beim Übergang von pH 7,4 zu pH 9 auf (Abb. 38B, vgl. Abb. 20). Während eine verlangsamte Reprotonierung bei pH 9 bereits in Analogie zu BR durch das Überschreiten des  $pK_s$ -Wertes der RSB erklärt wurde, ist die beschleunigte Reprotonierung unter sauren Bedingungen nicht trivial (vgl. Abs. 4.2). Diesbezüglich zeigen die Ergebnisse der CsR-His42Ala Mutante eine entscheidende Beteiligung des His42 auf (Abb. 38B). Diese Aminosäure ist oberhalb des primären Protonendonors Asp97 an der Grenzfläche zum zytoplasmatischen Raum lokalisiert (Abb. 38A) und ist in anderen BR-typischen Pumpen nicht konserviert (vgl. Abb. 6). In BR beispielsweise findet sich an dieser Position ein Phe42, während in Arch-3 diese Position durch Tyr52 okkupiert ist. Für BR wurde postuliert, dass Phe42 wie eine Verschlussklappe des zytoplasmatischen Halbkanales funktioniert, welche den Zugang zum zytoplasmatischen Medium trennt (Wang *et al.*, 2014). Auf Basis einer PROPKA-Analyse (Rostkowski *et al.*, 2011) wurde auf Grundlage der Dunkelzustandsstruktur für die Histidin-Seitenkette ein  $pK_s$ -Wert von  $\sim 5,4$  ermittelt. Dementsprechend würde His42 bei pH 5 vorrangig protoniert und bei pH 7,4 deprotoniert vorliegen. Da bei CsR-His42Ala zwischen pH 5 und pH 7,4 keine Veränderung der Reprotonierungsdynamik festgestellt wurde, und der M-Zerfall in der Mutante bei pH 5 gegenüber dem WT verlangsamt ist (Abb. 38B), könnte im WT die bei pH 5 induzierte Protonierung des His42 zu einer Absenkung des  $pK_s$ -Wertes von Asp97 führen und so die Deprotonierung dieses Restes erleichtern. Eine mögliche Erklärung dieses Umstandes kann darin begründet liegen, dass es durch die Protonierung von His42 zum Aufbrechen der H-Brücke mit dem Rückgratsauerstoff des Asp97 kommt (vgl. Abb. 16B), was zu einer hydrophileren Umgebung des Protonendonors führen kann. Die im Vergleich zum WT verlangsamte Reprotonierung der RSB bei pH 5 (Abb. 38B), könnte folglich damit erklärt werden, dass der  $pK_s$ -Wert von Asp97 im M $\rightarrow$ N-Übergang in CsR-His42Ala höher als im WT mit protonierter His42-Konfiguration ist, wodurch die Deprotonierung von Asp97 bei pH 5 erschwert wird. Bei pH 7,4 und 9 hingegen, ist die Reprotonierung der RSB im WT gegenüber der Mutante beschleunigt (Abb. 38B), was in Anbetracht der vorhergehenden Argumentation bedeuten würde, dass im WT mit deprotonierter His42-Konfiguration der  $pK_s$ -Wert von Asp97 gegenüber CsR-His42Ala erhöht ist. An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, dass weitreichendere, pH-induzierte konformationelle Änderungen des Histidins, wie sie beispielsweise für das Influenza Virus Hemagglutinin demonstriert wurden (Kalani *et al.*, 2013) nicht ausgeschlossen werden können. So könnte es mit der Protonierung des His42 zur gänzlichen Öffnung des zytoplasmatischen Verschlusses kommen, wodurch Asp97 in Kontakt zum zytoplasmatischen Medium stehen würde. Der Protonentransfer auf die RSB könnte dann direkt aus dem zytoplasmatischen Medium erfolgen.

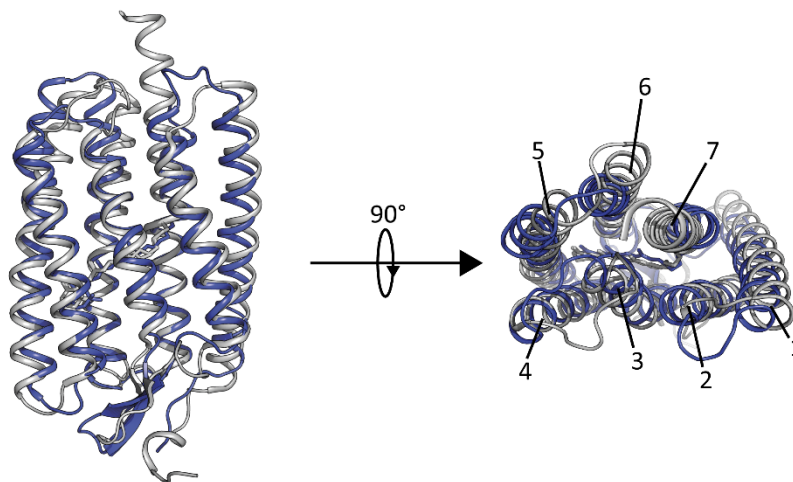
Ein anderer, an der Modulation der  $pK_s$ -Differenz beteiligter Rest, ist das um zwei Helixwindungen versetzte Ile49 (Abb. 38A). Ile49 sitzt dabei direkt oberhalb der RSB und ist somit maßgeblich an der Ausbildung der hydrophoben Kavität beteiligt, die die RSB und Asp97 trennt (vgl. Abb. 16A). Während diese Position in AR-1 und -2 ebenfalls durch ein Isoleucin besetzt wird, findet sich in lichtgetriebenen Pumpen aus Archaea ein Valin an der korrespondierenden Position (vgl. Abb. 6). Isoleucin besitzt gegenüber Valin einen erhöhten Hydrophobizitätswert (Monera *et al.*, 1995). Die Substitution des Ile49 durch ein Valin könnte entsprechend eine hydrophilere Umgebung der RSB schaffen, was in einer Verringerung des  $pK_s$ -Wertes resultiert und somit die Protonierung der RSB verlangsamen würde. Tatsächlich zeigte sich für CsR-Ile49Val bei allen drei pH-Werten eine gegenüber dem WT verlangsamte Reprotonierungskinetik der RSB (vgl. Abb. 38B). Dabei war der nominell größte Unterschied zum WT bei pH 9 festzustellen. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass unter alkalischen Bedingungen die Protonenaufnahme von der zytoplasmatischen Seite den geschwindigkeitslimitierenden Schritt in der Reprotonierung der RSB darstellt.

Wie oben bereits erwähnt, muss in einem zweiten Schritt die Reprotonierung des Asp97 sichergestellt werden. Dabei kommt es in BR mit der Deprotonierung von Asp96 zu einem Ausklappen von Helix 6, wodurch Asp96 mit dem intrazellulären Medium in Verbindung tritt (Wang *et al.*, 2013). Ob der Mechanismus der Reprotonierung von Asp97 in CsR damit vergleichbar ist, ist gegenwärtig nicht zu beantworten. Allerdings ist es durchaus vorstellbar, dass es durch konformationelle Änderungen der zytoplasmatischen Hälfte auch zu einer Annäherung von His42 und Asp97 kommen könnte, was His42 zu einem potentiellen Protonendonator des Asp97 machen würde. Dass Histidine in Proteinen als Protonen-Shuttle fungieren können, wurde bereits für eine Vielzahl anderer Proteine, wie beispielsweise Carboanhydrasen, dem Protonenkanal M2 aus Influenza-Viren, sowie dem spannungsaktivierten Kaliumkanal Kv1.2, gezeigt (Fisher *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2007).

Abschließend ist festzuhalten, dass in diesem Abschnitt dargelegt werden konnte, wie kinetische Unterschiede zwischen CsR und anderen lichtgetriebenen Protonenpumpen in der Reprotonierung der RSB auf einzelne Aminosäuren zurückzuführen sind. Da eben diese Prozesse für die Spannungsabhängigkeit des CsR verantwortlich sind, können auf Grundlage des Vergleiches struktureller Unterschiede verschiedener lichtgetriebener Pumpen Mutanten konzipiert werden, die eine geringere Spannungsabhängigkeit aufweisen. Gleichzeitig stellt die einzigartige Wechselwirkung mit His42 eine mögliche Erklärung dafür dar, dass in CsR die Substitution des Thr46 durch Asparagin die Spannungsabhängigkeit signifikant verringerte, während in BR und Arch-3 kein Effekt analoger Substitutionen festgestellt werden konnte (Vogt, 2017).

### 4.3 Mechanistische Unterscheidung aktiver und passiver Protonentransportprozesse

Der unerlässliche Transport von Ionen über die Zellmembran wird durch zwei Arten von Membranproteinen reguliert: Kanäle und Pumpen. Während Kanäle im offenen Zustand für ausgewählte Ionen permeabel sind, die dann gemäß dem elektrochemischen Gradienten durch die Proteine diffundieren, sind Pumpen durch energiekonsumierende Prozesse in der Lage, Ionen gerichtet gegen den elektrochemischen Gradienten zu bewegen und diesen so aufzubauen, beziehungsweise zu erhalten. Entsprechend wurden aufgrund ihrer diametral entgegengesetzten Wirkweise diese Proteinklassen traditionell als völlig verschiedene Entitäten aufgefasst (Gadsby, 2009). Doch neuere Erkenntnisse über die Struktur und den Funktionsmechanismus beider Proteinklassen machen deutlich, dass die Unterschiede zwischen aktivem Pump- und passivem Kanaltransport oft nur marginal sind. Dies kann exemplarisch an mikrobiellen Rhodopsinen verdeutlicht werden. Der strukturelle Vergleich lichtgetriebener Pumpen und lichtinduzierter Kanäle zeigt dabei die hohe Homologie beider Proteinklassen auf (Abb. 39).



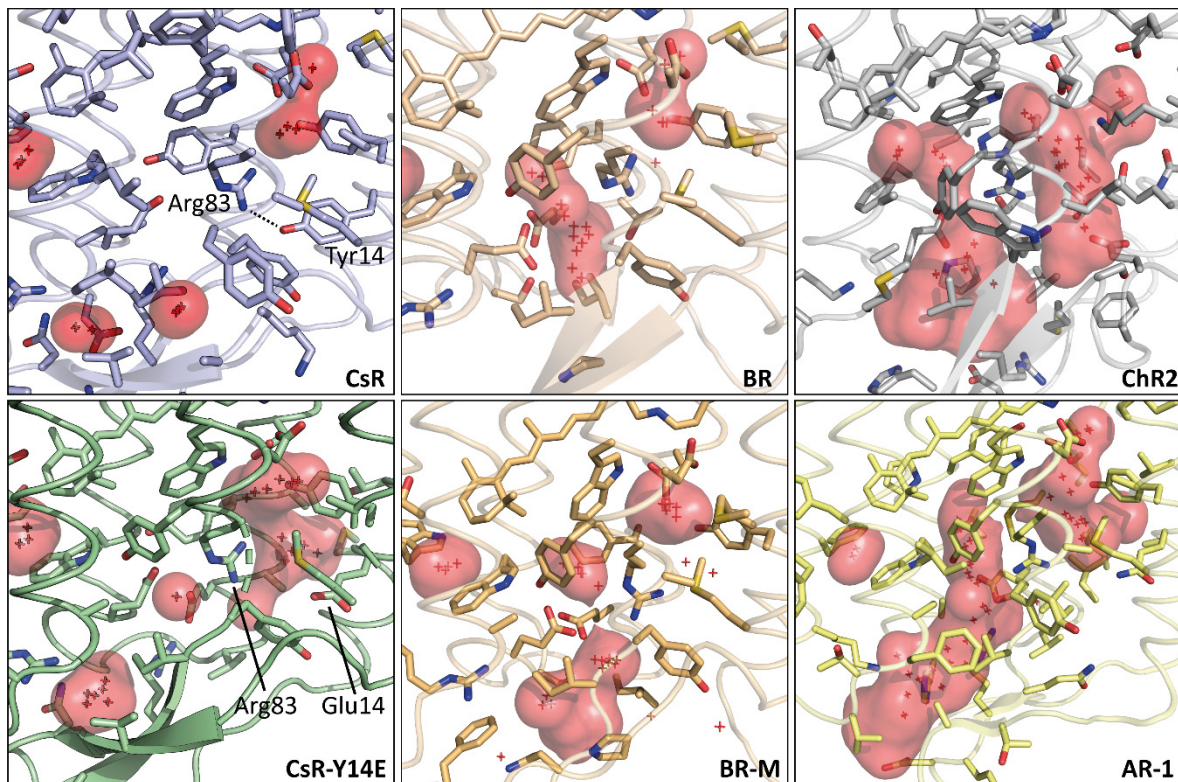
**Abbildung 39** C $\alpha$ -Überlagerung der CsR- (blau) und ChR2-Monomere [PDB: 6EID] (grau). Helices nummeriert.

Da es sich bei den funktionellen Einheiten elektrogener mikrobieller Rhodopsine um Monomere handelt, müssen mechanistische Unterschiede auf Unterschiede in der Konfiguration einzelner Kompartimente oder sogar auf strukturelle Unterschiede einzelner Reste zurückzuführen sein. Obwohl bereits Kristallstrukturen zweier kationselektiver Kanalrhodopsine gelöst sind (Kato *et al.*, 2012; Volkov *et al.*, 2017), konnten molekulare Determinanten der Transportmodi (aktiv vs. passiv), auch wegen einer fehlenden

Kristallstruktur der Kanalrhodopsine im leitenden (offenen) Zustand nicht eindeutig identifiziert werden. Dementsprechend sollen in diesem Abschnitt einige entscheidende, den unidirektionalen Transport erhaltende Reste, diskutiert werden. Insbesondere soll dabei die Funktionsweise der im Verlauf dieser Arbeit entwickelten Kanalmutante CsR-Tyr14Glu eruiert werden.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen mikrobiellen Pumpen und Kanälen besteht in der Konnektivität verschiedener Proteinhohlräume untereinander sowie der Zugänglichkeit zum außenstehenden Medium. Die einzelnen Segmente eines potentiellen leitenden Pfades werden hierbei durch so genannte Pforten (Englisch „*gates*“) getrennt, die im Verlauf des Photozyklus ihre Konfiguration ändern können und so die Verbindungen zwischen den Segmenten modulieren. Dabei kommt es im Photozyklus von Kanälen, anders als bei Pumpen, zur Ausbildung einer Pore durch das ganze Protein, die den passiven Ionentransport gestattet und entsprechend als leitender oder offener Zustand deklariert wird. Die genauen molekularen Gegebenheiten eines solchen leitenden Zustandes sind für ChR2 nicht gänzlich verstanden. Es wird jedoch angenommen, dass dieser Zustand erst mit der Reprotonierung der RSB auftritt (Bamann *et al.*, 2008; Berndt *et al.*, 2009) und die Pore durch ein Umkippen von Helix 2 und 6 ausgebildet wird (vgl. Abb. 39; Sattig *et al.*, 2013). Bei lichtgetriebenen Protonenpumpen kommt es im Zuge der Reprotonierung der RSB ebenfalls zur Öffnung des zytoplasmatischen Halbkanals, wobei es allerdings deutliche Unterschiede zur Kanalöffnung lichtaktivierter Kanäle gibt (vgl. Abs. 4.2.2). Um den passiven Rückfluss von Protonen zu verhindern, kommt es im Laufe des Photozykluses zu einer Verriegelung der extrazellulären Hälfte, die entweder die Zugänglichkeit zum extrazellulären Medium oder die Interkonnektivität der beiden Wassercluster der jeweiligen Proteinhälften unterbindet. Die Struktur der BR-Mutante Val49Ala, welche eine mögliche N-Intermediatsstruktur darstellt (Schobert, Brown and Lanyi, 2003), gibt Aufschluss über die Konfiguration der extrazellulären Seite während des Reprotonierungsschrittes der RSB. Dabei wurde demonstriert, dass die extrazelluläre Seite, anders als der zytoplasmatische Teil, im N-Intermediat eine zum Dunkelzustand ähnliche Konfiguration aufweist. Zur Veranschaulichung dieser Konfiguration wurden die Hohlräume der extrazellulären Hälften von BR und anderen elektrogenen Rhodopsinen berechnet und sind in Abbildung 40 dargestellt. Im BR existieren im Dunkelzustand zwischen der RSB und dem PRC zwei tragende Kavitäten (Abb. 40, obere Reihe mittig), die durch Arg82 voneinander getrennt sind. Weiterhin wird der Kontakt zum extrazellulären Medium durch die Konfiguration des PRC unterbunden. Im Zuge der Deprotonierung der RSB und den damit verbundenen strukturellen Änderungen (vgl. Abs. 1.3.1.1), kommt es zur Ausbildung einer Kontaktfläche mit dem extrazellulären Medium, während der Zugang zur RSB weiterhin durch das Arg82 getrennt wird (Abb. 40, untere Reihe mittig). Auch in ChR2 (Abb. 40, obere Reihe

rechts) und AR-1 (Abb. 40, untere Reihe rechts), wo bereits im Dunkelzustand der Kern der extrazellulären Hälfte dem extrazellulären Medium zugänglich ist, wird die RSB durch ein dem Arg82 analoges Arginin abgeschirmt. Da ChR2 allerdings als Kanal und AR-1 als Pumpe funktionieren, muss es im Laufe des Photozyklus zu verschiedenartigen Neuorientierungen dieses Arginins kommen, die im Fall von ChR2 passive Ströme zulassen und im Fall von AR-1 etwaige verhindern.



**Abbildung 40** Darstellung der mittels HOLLOW berechneten Kavitäten (rot) innerhalb der extrazellulären Hälften von CsR (blau), BR (weizen) [PDB: 1C3W], ChR2 (grau) [PDB: 6EID], CsR-Y14E (grün, modelliert durch Dr. Gunnar Klein, AG Proteinstrukturanalyse/Kristallisation, Charité Berlin), BR-M (orange) [PDB: 1C8S] und AR-1 (gelb) [PDB: 5AWZ]. Die an der Ausbildung der Kavitäten beteiligten Reste sind als Strichmodell dargestellt.

Noch rigider als in BR ist die Konfiguration der extrazellulären Hälfte in CsR (Abb. 40, obere Reihe links). Während die berechneten Kavitäten des Gegenionkomplexes beider Proteine noch in etwa identisch sind, ist in CsR durch die besondere Konfiguration des PRC (vgl. Abb. 14A) „unterhalb“ des Arg83 keine zweite zum BR vergleichbar große Kavität erkennbar. Zusammengenommen scheint es aus dem strukturellen Vergleich legitim, Arg83 eine tragende Rolle in der Organisation des vektoriellen Transportes in mikrobiellen Rhodopsinen zuzuschreiben. Tatsächlich wurde die Bedeutung des Arg82 für BR als funktionale Barriere zwischen der RSB und dem extrazellulären Raum bereits aufgrund spektroskopischer Befunde diskutiert (Kandt, Schlitter and Gerwert, 2004; Garczarek *et al.*, 2005). Allerdings zeigten erst elektrophysiologische Messungen direkt auf, dass es durch

Substitutionen von Arg82 in BR bzw. Arg83 in CsR durch ein Glutamin, zu deutlich verringerten Pumpleistungen und lichtinduzierten Leckströmen kommt (Vogt *et al.*, 2015). Da diese modifizierten „undichten Pumpen“ (Englisch „*leaky pumps*“) einen residualen Pumpanteil besaßen und somit keine reinen Kanäle darstellten, wurde durch Dr. Arend Vogt ein theoretischer „Pump-Kanal-Dualismus“ diskutiert, auf den im Laufe dieses Abschnittes noch näher eingegangen wird.

Wie zu erwarten war hatte die Substitution des zentralen Arg83 durch Glutamin auch einen starken Einfluss auf die Photochemie des Proteins (vgl. Abb. 23). Die in der spektroskopischen Charakterisierung der CsR-Arg83Gln Mutante festgestellte gegenüber dem WT beschleunigte Formation des M-Zustandes könnte auf eine veränderte Konfiguration des Gegenionkomplexes zurückgeführt werden, die sich auch in der beobachteten hypsochromen Verschiebung des Dunkelzustandes äußert (vgl. Abb. 22B). Die fehlende Akkumulation des O-Intermediates (vgl. Abb. 23A, B) hingegen könnte als veränderte Zugänglichkeit des primären Protonakzeptors zum extrazellulären Raum interpretiert werden. Käme es aufgrund der fehlenden Guanidiniumgruppe des Arg83 zur Vergrößerung der extrazellulären Hohlräume, erhöhe dies die Wahrscheinlichkeit, dass Asp86 in Kontakt mit einem Wassermolekül tritt und so transient deprotonieren kann. Diese Hypothese wird durch MD-Simulationen an der BR-Arg82Gln Mutante unterstützt, die eine vergrößerte extrazelluläre Kavität im Dunkelzustand des Proteins voraussagen (Vogt *et al.*, 2015). Ebenfalls könnte es in CsR-Arg83Gln durch die fehlende positive Ladung zu einer Anhebung des  $pK_s$ -Wertes des PRC kommen, wie sie bereits für BR-Arg82Gln beschrieben wurde (Govindjee *et al.*, 1996). Dadurch wird die Protonenabgabe von Asp86 zum PRC vereinfacht bzw. beschleunigt und stellt so eine alternative Erklärung für die fehlende O-Akkumulation in den spektroskopischen Untersuchungen dar. Der Fortbestand des aktiven Transportes in der Mutante bei neutralen pH-Bedingungen (auswärtsgerichtete Ströme selbst bei starken negativen Haltepotentialen ( $> -100$  mV); Vogt *et al.*, 2015) verdeutlicht, dass die Kopplung zwischen Gegenionkomplex und PRC zwar durch Arg83 moduliert jedoch nicht mediiert wird. Dementsprechend wird der unidirektionale Transport auch in Abwesenheit von Arg83 beibehalten, wenn auch die Pumpkraft stark reduziert ist. Inwieweit die fehlende, in Analogie zu BR antizipierte, Umorientierung des Arg83 zum EZ dabei den Zeitpunkt der Protonenfreisetzung beeinflusst bleibt unbeantwortet und kann Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bilden. Ebenso wird durch den Erhalt des unidirektionalen Stromes in der Mutante die Rolle des PRC als extrazelluläre Pforte unterstrichen, die in der Lage ist den passiven Protonenrückfluss auch ohne eine zusätzliche Abschirmung durch Arg83 zu unterbinden. Konsequenterweise implizieren die für CsR-Arg83Gln bei einem äußeren pH von 5 und Haltespannungen  $\leq 75$  mV detektierten einwärtsgerichteten Ströme, dass es unter sauren extrazellulären Bedingungen



zu strukturellen Änderungen innerhalb des PRC kommt, die die beschriebene Barrierefunktion dieses Kompartimentes annihilieren.

In CsR-Ala56His liegt Asp86 bei pH 5 bereits im Dunkelzustand vollständig protoniert vor (vgl. Abb. 26B), sodass in zeitaufgelösten Messungen bei pH 5, anders als bei CsR-Arg83Gln, keine Akkumulation des M-Intermediates beobachtet werden konnte und es entsprechend nicht zur Deprotonierung der RSB kam (vgl. Abb. 27B). Dies impliziert auch, dass Asp86 in CsR-Ala56His nach der Isomerisierung des Chromophors abgeschirmt bleibt, sodass eine transiente Deprotonierung von Asp86 verhindert wird, wodurch es auch im weiteren Verlauf des Photozykluses nicht als Protonenakzeptor für die RSBH<sup>+</sup> fungieren kann. Konträr zu dem spektroskopischen Befund, belegen elektrophysiologische Untersuchungen an CsR-Ala56His selbst bei einem äußeren pH von 4 und 0 mV Haltespannung noch auswärtsgerichtete Ströme (Vogt, 2017), was nur durch einen intakten Pumpzyklus realisiert werden kann. Bei einer Erhöhung des elektrochemischen Gradienten durch das Anlegen von negativen Spannungen konnten jedoch ebenfalls einwärtsgerichtete Photoströme beobachtet werden (Vogt, 2017). Für BR wurde berichtet, dass der Protonierungsgrad des primären Protonakzeptors Asp85 auch die Orientierung von Arg82 beeinflusst (Scharnagl and Fischer, 1996). Demnach könnte es bei CsR-Ala56His in saurem Milieu (pH ≤ 5) auch zu einer Neuausrichtung von Arg83 kommen. Die Tatsache, dass für CsR-Ala56His passive Ströme allerdings nur bei negativen Haltepotentialen beobachtet werden konnten, spricht für zusätzliche spannungsinduzierte Konformationsänderungen des Proteins. Diese spannungsabhängigen strukturellen Änderungen können dabei durch induzierte Protonierungen der extrazellulären polaren Aminosäuren (Glu193, Asp196, Glu203, vgl. Abb. 14A) bedingt sein. Die Annahme, dass ähnliche strukturelle Änderungen bei CsR-Arg83Gln (siehe oben) bereits pH-induziert auftreten, könnte zum einen durch das Wegfallen der im WT beobachteten direkten Wechselwirkung des Arg83 mit Glu204 (vgl. Abs. 3.2.1.2) legitimiert werden. Zum anderen kommt es durch die Abwesenheit der positiv geladenen Guanidingruppe zu einer Anhebung des pK<sub>s</sub>-Wertes vom PRC im M-Intermediat, was für das Auftreten von Protonierungsreaktionen bereits bei pH 5 ohne zusätzliche Spannungsmodulation mitverantwortlich sein kann (Govindjee *et al.*, 1996). Für die im Vergleich zu CsR-Ala56His großen Stromamplituden der passiven einwärtsgerichteten Ströme in der CsR-Arg83Gln Mutante (Vogt, 2017) können hierbei drei Gründe aufgeführt werden. Zum einen könnte die durch Arg83 ausgebildete Pforte der extrazellulären Hälfte in CsR-Ala56His zum Teil intakt bleiben, so dass der passive Protonenfluss teilweise unterbrochen wird. Zum anderen könnte der residuale Pumpanteil in CsR-Ala56His gegenüber CsR-Arg83Gln erhöht sein, wodurch sich die Differenz aus aktivem auswärtsgerichteten und passivem einwärtsgerichteten Strom verringert. Letztlich könnte die verlangsamte Reisomerisierung des Retinals in CsR-Arg83Gln



(vgl. Abb. 23) zu den größeren Amplituden beitragen. Diesbezüglich demonstrierten Studien an BR, dass die Deprotonierung des BR-Asp96 mit der Öffnung des zytoplasmatischen Halbkanals verknüpft ist (Wang *et al.*, 2013; vgl. Abs. 4.2.2). Gleichzeitig wird die Reisoomerisierung des Retinals mit der Reprotonierung des Protonendonors BR-Asp96 assoziiert (Dioumaev *et al.*, 2001). Kommt es wie im Fall von CsR-Arg83Gln zu einer verlangsamten Reisoomerisierung des Retinals, kann man von einer entsprechend verlängerten „Offen“-Periode des zytoplasmatischen Halbkanals ausgehen, so dass im Verlauf eines Photozyklus mehr Protonen durch das Protein diffundieren können.

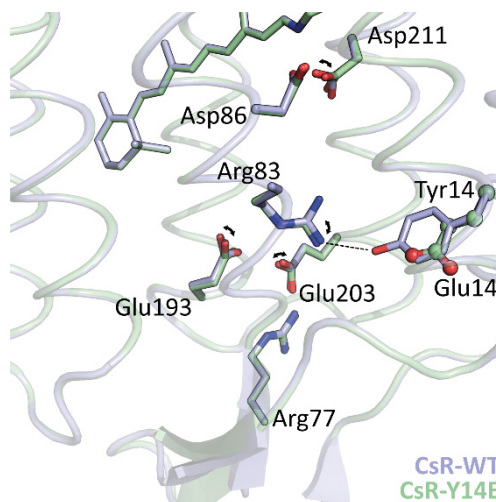
Die hier dargelegte strukturbasierte Betrachtung der passiven Transportprozesse für undichte CsR-Mutanten verdeutlicht, dass neben Arg83 auch der PRC als extrazelluläre Pforte zum Erhalt des vektoriellen Transportes in CsR beiträgt. Die Tatsache, dass Mutationen des PRC allein jedoch keine einwärtsgerichteten Ströme verursachten (Vogt *et al.*, 2015), zeigt ebenfalls eine in diesem Kontext untergeordnete Rolle des PRC gegenüber Arg83 auf. Weiterhin können passive Ströme nur auftreten, wenn neben der extrazellulären Hälfte auch die zytoplasmatische Seite eine offene Konfiguration einnimmt und die beiden Wassercluster der jeweiligen Proteinhälften miteinander in Verbindung treten. Folglich ist der Einfluss des Gegenionkomplexes zur Funktion des Proteins keineswegs diskret (Beginn und Ende des Photozyklus), sondern trägt kontinuierlich zum Erhalt des aktiven Transportes bei. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Gegenionmutante CsR-Tyr57Lys weitergehend zu untersuchen, sodass der mechanistische Einfluss des Gegenionkomplexes nicht weiter präzisiert werden kann.

Da bisherige Kanalmutanten des CsR vorrangig durch Substitutionen konservierter Reste des Gegenionkomplexes oder damit assoziierter Reste der extrazellulären Hälfte erzeugt wurden, können sekundäre, schwer nachvollziehbare Effekte auf die Funktionsweise dieser Proteine nicht ausgeschlossen werden. Um eine bessere quantitative Betrachtung zur Unterscheidung des aktiven und passiven Transportes zu gewährleisten, sollten neuartige Kanalmutanten entwickelt werden, die essentielle Proteinsegmente wie den Gegenionkomplex und den PRC unangetastet lassen. Die in der Kristallstruktur beobachtete einzigartige Wechselwirkung zwischen Arg83 und Tyr14 erlaubte eine Perturbation des für den aktiven Transport essentiellen Arginins unter den oben genannten Voraussetzungen. Dabei konnten für die CsR-Mutante Tyr14Glu fast symmetrische bidirektionale Ströme bereits unter physiologischen Bedingungen festgestellt werden (vgl. Abb. 31D). Bei quasisymmetrischen pH-Bedingungen (pH 7,4) und 0 mV Haltespannung wurde jedoch eine residuale Pumpaktivität der Mutante festgestellt, die in Übereinstimmung mit dem Pump-Kanal-Dualismus früherer

Kanalmutanten steht. Interessanterweise zeigte sich durch den Vergleich der Umkehrpotentiale bei verschiedenen pH-Bedingungen, dass CsR-Tyr14Glu unter alkalischen extrazellulären Bedingungen als reines passives System funktionierte, während der Pumpanteil am Gesamtstrom unter sauren Bedingungen zunahm (private Mitteilung Dr. Arend Vogt, nicht gezeigt). Unter der Annahme, dass die Ausbildung einer attraktiven Wechselwirkung zwischen Glu14 und Arg83 im Verlaufe des Photozyklus die Voraussetzung passiver Ströme darstellt, kann die Zunahme des Pumpanteils am Gesamtstrom unter sauren Bedingungen durch eine induzierte Protonierung des Glu14 erklärt werden. Da eine Protonierung des  $\gamma$ -Carboxyls von Glu14 mit einer Neutralisation des sonst anionischen Carboxylat-Ions einhergeht, würde dadurch die elektrostatische Wechselwirkung mit der positiven Guanidiniumgruppe des Arginins geschwächt werden, was zu einer WT-ähnlicheren Konfiguration des Arg83 führen könnte. Weiterhin legen die Ergebnisse der spektroskopischen Charakterisierung dar, dass eine deutliche Verlangsamung der Kinetik des K $\rightarrow$ M-Überganges in der Mutante erst unter alkalischen Bedingungen beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 33F). Diesbezüglich zeigten röntgenkristallographische Untersuchungen an BR, dass die Annäherung der extrazellulären Segmente von Helix 3 und Helix 7, die einer Bewegung von Helix 3 vorbei an Helix 1 gleichkommt, den geschwindigkeitslimitierenden Schritt in der Deprotonierung der RSB ausmachen (Nango *et al.*, 2016). Folgerichtig deutet der verlangsamte K $\rightarrow$ M Übergang unter alkalischen Bedingungen auf eine starke Interaktion des Arg83 (Helix 3) mit Glu14 (Helix 1) hin. Konsequenterweise muss ergänzt werden, dass diese Wechselwirkung bei pH 7,4 nicht vorhanden oder zumindest stark abgeschwächt ist, da die Übergangskinetiken von CsR-Tyr14Glu in diesem Fall den für den WT beobachteten Kinetiken entsprechen (vgl. Abb. 33E). Die Tatsache, dass der scheinbare  $pK_S$ -Wert des Glu14 ( $pK_{S-Glu14} \sim 8$ ) dabei ungewöhnlich hoch ist (vgl.  $pK_{\gamma-COOH}$ : 4,32), kann auf die stark hydrophobe Umgebung des Restes, die sich in der Dunkelzustandskonfiguration aus Ile6, Tyr57, Met60, Tyr80 und Ala204 zusammensetzt zurückgeführt werden. Gleichbedeutend damit erscheint es unwahrscheinlich, dass eine Wechselwirkung zwischen Arg83 und Glu14 bereits im Dunkelzustand besteht.

Eine mögliche Konfiguration von CsR-Tyr14Glu wurde durch kurze (1 ns) molekulardynamische(MD)-Simulationen mit eingeschränkter Bewegung des Proteinrückgrates durch Dr. Gunnar Klein (AG Proteinstrukturanalyse/Kristallisation, Charité Berlin) modelliert und ist in Abbildung 41 dargestellt. Die auf Grundlage dieser Struktur berechneten Kavitäten sind in (Abb. 40, untere Reihe links) abgebildet. Im Modell ist erkennbar, dass Glu14 nicht zu Arg83 orientiert ist (Abb. 41, grün), was in guter Übereinstimmung zu dem oben beschriebenen hohen  $pK_S$ -Wert des Glu14 steht. Weiterhin kommt es zu einer minimalen Verschiebung des Arg83 in Richtung des EZ sowie einer Rotation des Asp211, wodurch die in

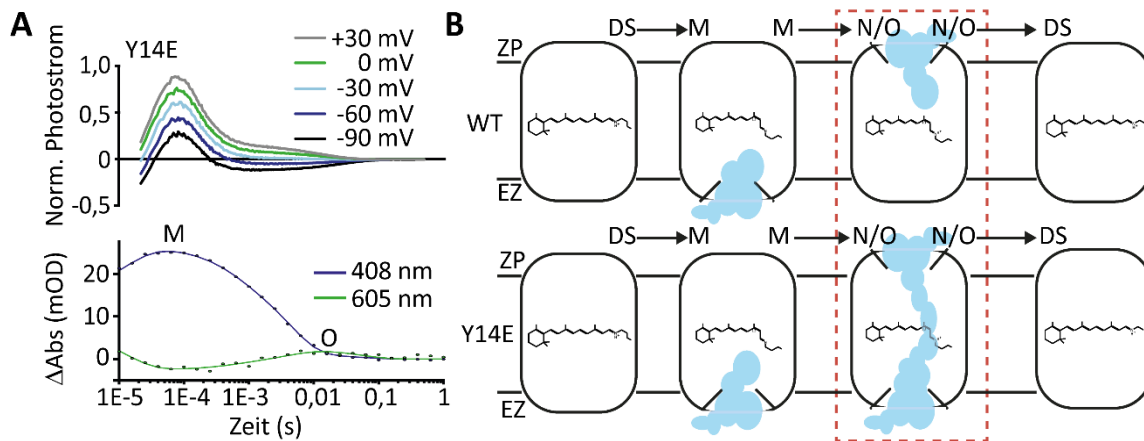
der Mutante beobachtete leichte hypsochrome Verschiebung gegenüber dem WT (vgl. Abb. 32B) teilweise legitimiert werden kann. In dieser Konfiguration kommt es insbesondere zwischen dem Gegenionkomplex, Arg83 und Glu14 zur Vergrößerung der extrazellulären Kavität, wobei der Zugang zum EZ weiterhin unterbrochen bleibt (Abb. 40, untere Reihe links). Die Zugänglichkeit des Proteinkerns zum EZ, die für die Ausbildung Kanalpore essentiell ist, muss demnach durch weitere Konformationsänderungen innerhalb der EZ-Hälfte bewirkt werden. Inwieweit die modellierte Konfiguration der Realität entspricht, lässt sich abschließend nur durch eine Kristallstruktur der Tyr14Glu-Mutante klären. Bei ersten Testreihen konnten tatsächlich Kristalle der Mutante vermessen werden. Diese streuten allerdings nur anisotrop (Appendix Abb. A6), so dass eine Kristallstruktur nicht gelöst werden konnte. Da die Kristalle in einer Bedingung mit pH 7,5 gewachsen sind, kann ein möglicher heterogener Grundzustand verschiedener Monomere im Kristall, bei dem Glu14 protoniert bzw. deprotoniert vorliegt, ein Grund für die anisotrope Diffraktion sein.



**Abbildung 41** Ausschnitt der extrazellulären Hälfte der  $C_{\alpha}$ -Überlagerung kurzer (1 ns) MD-Simulationen von CsR-WT (blau) und CsR-Y14E (grün) mit eingeschränkten Freiheitsgraden des Proteinrückgrates. Veränderungen in der Konfiguration einzelner Aminosäurereste durch gebogene Pfeile angedeutet.

Nichtsdestotrotz zeigte CsR-Tyr14Glu anders als frühere Kanalmutanten eine robuste Expression in HEK293-Zellen, was blitzlichtstimulierte elektrophysiologische Untersuchungen ermöglichte. Die von Johannes Vierock (Humboldt-Universität zu Berlin) gemessenen Stromkurven zeigen deutlich, dass die beim WT beobachtete (vgl. Abb. 37A) initiale Ladungsverschiebung unter symmetrischen Bedingungen (pH 7,2, 150 mM NaCl) auch in CsR-Tyr14Glu erhalten bleibt (Abb. 42A, oberes Panel). Die Formation dieses auch unter starken negativen Haltespannungen auswärtsgerichteten transienten Stromes ist dabei in zeitlicher Übereinstimmung mit der Bildung des M-Intermediates (Abb. 42A, unteres Panel). Spannungsabhängige bidirektionale Ströme, wie sie bei Dauerlichtmessungen in Oozyten

beobachtet wurden sind erst in einem späteren Zeitbereich erkennbar, welcher mit dem Zerfall des M-Intermediates und der Entstehung des nachfolgenden O-Intermediates korreliert (Abb. 42A). An dieser Stelle soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die dargestellten Stromspuren mit einer logarithmischen Skalierung aufgetragen sind. Entsprechend übersteigt die absolute Menge der im Millisekundenbereich transportierten Ladung die initiale Ladungsverschiebung um ein Vielfaches (vgl. Abb. 37B) und stimmt so mit den großen Amplituden überein, die unter stationärer Belichtung beobachtet wurden (vgl. Abb. 31D).



**Abbildung 42** **A Oben:** Normierte blitzlichtinduzierte Photoströme des CsR-Tyr14Glu bei verschiedenen Haltespannungen, aufgenommen und ausgewertet durch Johannes Vierock mittels Patch-Clamp-Messungen an HEK293-Zellen bei symmetrischen Bedingungen (pH 7,2, 150 mM NaCl). **Unten:** Kinetischer Verlauf der für M und O repräsentativen Trajektorien des aufgereinigten CsR-Tyr14Glu bei pH 7,4. Extrahiert aus Abb. 32. **B** Comicstrip der angenommenen konformationellen Änderungen im Laufe des Photozyklus des CsR-WT (oben) und Tyr14Glu (unten). Während im WT die extrazelluläre und die zytoplasmatische Pforte nur alternierend eine offene Konformation annehmen, kommt es in CsR-Tyr14Glu zur Ausbildung eines Protonenpfades durch das Protein im N/O-Intermediat. Detaillierte Beschreibung im Text.

Der kinetische Verlauf der Stromspuren lässt sich dabei in Anbetracht der oben diskutierten pH-abhängigen Wechselwirkung zwischen Arg83 und Glu14 evaluieren. Danach liegt Glu14 bei pH 7,2 weitestgehend protoniert vor, wodurch es in der Mutante zu einer WT-ähnlichen Dunkelzustandskonfiguration kommt. Dementsprechend verlaufen frühe elektrogene Photozyklusschritte der Mutante analog zum WT. Weil aber auf diesen unidirektionalen Transport bidirektionale Ströme folgen, muss es nach der Deprotonierung der RSB zu strukturellen Änderungen innerhalb des Proteins kommen, die zur Ausbildung der potentiellen Glu14-Arg83 Salzbrücke führen und so im späteren Verlauf des Photozyklus die Ausbildung einer Pore durch das ganze Protein erlauben. Dabei könnte eine durch Konformationsänderungen induzierte Neuausrichtung des Glutamates in einer hydrophileren Umgebung zum Absenken des  $pK_s$ -Wertes dieses Restes führen und so eine transiente Deprotonierung von Glu14 ermöglichen. Dadurch könnte in einem Folgeschritt eine Interaktion des Glu14 zu Arg83 ausgebildet werden. Da die Kanalströme in einem Zeitbereich

des M→O-Überganges auftreten (Abb. 42) und somit mit der Reprotonierung der RSB korrelieren, scheint die Dauer der Kanalöffnung durch die Lebensdauer des N-Intermediates bestimmt zu sein (vgl. Abs. 4.2.2). Untersuchungen an dem Kanalrhodopsin *GtCCR2* demonstrierten übereinstimmend, dass der offene Zustand des Kanals durch den Protonierungsgrad des Asp97 analogen Protonendonors Asp98 kontrolliert wird (Sineshchekov *et al.*, 2017).

Der Zerfall des O-Intermediates, der die Deprotonierung des primären Protonenakzeptors Asp86 zum PRC markiert und so die letzte elektrogene Komponente im Photozyklus darstellt, ist in CsR-Tyr14Glu gegenüber dem WT beschleunigt (vgl. Abb. 33). Da es durch die Ausbildung der Arg83-Glu14-Salzbrücke zu einer veränderten hydratisierten Pore innerhalb der extrazellulären Hälfte des Proteins kommen könnte, kann Asp86 durch den Kontakt mit einem Wassermolekül transient deprotonieren, was den beschleunigten O-Zerfall erklären würde. Andererseits kann die Abwendung der geladenen Seitengruppe des Arg83 einen Einfluss auf den  $pK_s$ -Wert des PRC haben. Studien an BR zeigten, dass bereits die Substitution des Arg82 mit Lysin zu einer leichten Anhebung des  $pK_s$ -Wertes des PRC führt (Govindjee *et al.*, 1996). Käme es im Fall von CsR-Tyr14Glu innerhalb einer potentiellen O-Konfiguration ebenfalls zu einer Anhebung des  $pK_s$ -Wertes des PRC könnte dies die Deprotonierung von Asp86 zum PRC beschleunigen.

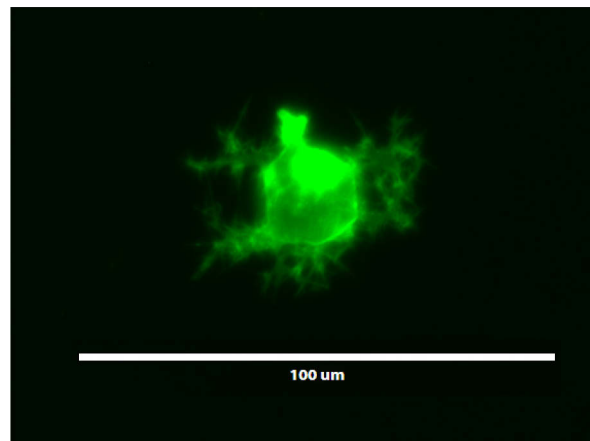
Der hier vorgestellte Mechanismus der Protonentranslokation in der kanalartigen CsR-Mutante Tyr14Glu, trägt entscheidend zum Verständnis eines intramolekularen Pump-Kanal-Dualismus bei. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter neutralen pH-Bedingungen die überlagerten Pump- und Kanalströme zeitlich segregiert werden können. Die aktive Protonenübertragung auf Asp86 und die mögliche Protonenfreisetzung an der extrazellulären Seite bedingen in der Folge die Möglichkeit der Ausbildung eines passiven protonenselektiven Kanals. Die Pore wird dabei durch konformationelle Änderungen auf der zytoplasmatischen Seite gebildet, die im WT zur Reprotonierung der RSB unabdingbar sind. Eine vereinfachte Zusammenfassung der konformationellen Änderungen ist in Abbildung 42B dargestellt. Tatsächlich zeigt das oben bereits angesprochene *GtCCR2* einen ähnlichen Mechanismus. Auch dort kommt es mit der Deprotonierung der RSB zu einem initialen Auswärtsstrom, auf den im Laufe des Photozyklus bidirektionale passive Transportprozesse folgen (Sineshchekov *et al.*, 2017). Dieser Kanal leitet allerdings, anders als CsR-Tyr14Glu, vorrangig monovalente Kationen. Weiterhin besitzen keine dieser Kanalrhodopsine aus Cryptophyceae ein konserviertes PRC-Motiv. Auch das sonst hochkonservierte Arg83 ist in diesen Kanälen durch ein Prolin oder ein Lysin substituiert (Yamauchi *et al.*, 2017). Da keine Kristallstruktur der Kanalrhodopsine aus Cryptophyceae verfügbar ist, bleiben die molekularen Gegebenheiten der

extrazellulären Hälfte unverstanden. In diesem Zusammenhang soll nicht unerwähnt bleiben, dass der hier vorgestellte Mechanismus für CsR-Tyr14Glu nur ein mögliches Modell zur Erklärung passiver Ströme in den kanalartigen Mutanten darstellt. Dabei sollte durch das beschriebene Modell ein generalisierter Mechanismus aufgezeigt werden, der auch Ergebnisse früherer undichter Pumpen zu erklären vermag. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich der extrazelluläre Protonenpfad im Fall von CsR-Tyr14Glu direkt aus der Arg83-Glu14-Wechselwirkung konstituiert. In dem spannungsaktivierten Protonenkanal Hv1 zum Beispiel, rekrutiert sich der Selektivitätsfilter aus der Wechselwirkung eines konservierten Arginins mit einem Aspartat, für den eine direkte Beteiligung an der Protonenleitung durch eine Protonierung und anschließende Deprotonierung der Carboxylsäure vorgeschlagen wurde (Dudev *et al.*, 2015). Auch der Vergleich mit Kanalrhodopsinen verdeutlicht, dass sich Glu14 in der Nähe zu dem in Kanalrhodopsinen als Glu5' annotierten Glutamates befindet (Schneider, Grimm and Hegemann, 2015). Dieses Glutamat ist entscheidend für die effiziente Protonenleitung, in dem protonenselektiven Kanalrhodopsin Chrimson und für die residuale Protonenleitung des entwickelten anionselektiven Kanalrhodopsins ChloC verantwortlich (Wietek *et al.*, 2015; Vierock *et al.*, 2017). Ob Glu14 tatsächlich als Protonenshuttle fungiert und so einen alternativen Protonenpfad in der extrazellulären Hälfte etabliert, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend zu beantworten. Zeitaufgelöste Differenz-FTIR-Messungen könnten diese Frage in Zukunft adressieren.

### 4.4 CsR als optogenetisches Werkzeug

Der Nachweis der Funktion der Kanalrhodopsine als lichtinduzierte Kationenkanäle und die folgende erfolgreiche Anwendung zur lichtinduzierten Depolarisation von Neuronen (vgl. Abs. 1.4) lösten eine regelrechte Revolution innerhalb der neurobiologischen Forschung aus. Mit dem immensen Erfolg verschiedener Kanalrhodopsine als optogenetische Werkzeuge rückten auch andere mikrobielle Rhodopsine in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Dabei stand die Suche nach Werkzeugen mit verschiedenen Charakteristika für diverse neurobiologische Fragestellungen im Vordergrund. Entsprechend sollte unter anderem neben der De- auch die Hyperpolarisation von Neuronen mithilfe mikrobieller Rhodopsine ermöglicht werden. Dabei zeigten die lichtaktivierten Protonenpumpen Arch-3 (in der Publikation von Chow *et al.*, 2010 als „Arch“ aufgeführt) und Mac (aus dem Pilz *Leptosphaeria maculans*) die Möglichkeit einer effektiven Stilllegung von Neuronen auf, die aufgrund der schnellen Regeneration der Neuronen gegenüber dem pH-Gradienten die Physiologie der

Nervenzellen nicht exzessiv beeinträchtigten und so ein Vorteil gegenüber anderen optogenetischen Werkzeugen darstellen (Chow *et al.*, 2010). Nachfolgende Experimente mit einem verwandten Rhodopsin aus dem Archaeon *Halorubrum* TP009 (ArchT), welches eine im Vergleich zu den auf Arch-3 basierten Varianten weiterverbesserte Expression und somit eine erhöhte Lichtempfindlichkeit der transfizierten Zellen aufwies, erlaubten den Einsatz lichtgetriebener Pumpen für optogenetische Anwendungen in größeren Gewebevolumina (Han *et al.*, 2011). Demnach ist die funktionale Expression mikrobieller Rhodopsine in heterologen Wirtszellen ausschlaggebend für die Qualifikation als optogenetisches Werkzeug. Dabei zeigt CsR eine im Vergleich zu Arch drastisch verbesserte Membraneinbettung in HEK293-Zellen, die in erhöhten Stromamplituden resultieren (Vogt *et al.*, 2015). Auch erste Expressionstests in ND7/23-Zellen (Hybridzellen aus Maus Neuroblastom und Dorsalwurzel Ganglion aus Ratten) zeigen die hervorragende Expression von CsR in Zellen mit neuronaler Morphologie (Abb. 43), was eine ebenfalls starke Expression in anderen neuronalen Zellen vermuten lässt. Entsprechend scheint CsR im Kontext funktionaler Expression prinzipiell als inhibitorisches optogenetisches Werkzeug geeignet.



**Abbildung 43** Fluoreszenzaufnahme einer 40x vergrößerten ND7/23-Zelle 24 Std nach Transfektion mit CsR-eGFP, aufgenommen mit LifeTechnologies EVOS FL Fluoreszenzmikroskop. Transfektion der Zelle wurde durch Christiane Grimm (Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt.

Ein Nachteil bei der Anwendung von CsR in Neuronen stellt die hohe Spannungsabhängigkeit der stationären Stromamplituden dar. Da es bei negativen Membranspannungen (Ruhepotential der meisten Säugerzellen  $\sim -50$  bis  $-100$  mV) zu verlangsamten Photozykluskinetiken kommt (vgl. Abs. 4.2.1 und 4.2.2), ist die Anzahl der Photozyklusdurchläufe und somit die Anzahl an transportierten Protonen bei langen Belichtungszeiten reduziert. Diese Reduktion der Pumpleistung vermindert die Effektivität von CsR im Sinne einer optogenetischen Anwendung. Entsprechend muss hinsichtlich einer möglichen Anwendung die Spannungsabhängigkeit verringert werden. Dies konnte bereits

teilweise mithilfe der Substitution von Thr46 durch ein Asparagin realisiert werden (Vogt *et al.*, 2015). Die Ausführungen in Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2 lassen den Schluss zu, dass durch weitere Mutationen des zytoplasmatischen Halbkanals, sowie des PRC, die Spannungsabhängigkeit weiter reduziert werden kann.

Andererseits kann die hohe Spannungsabhängigkeit der späten Photozyklusprozesse ausgenutzt werden, um auf Basis von CsR neue rhodopsinbasierte Fluoreszenz-Spannungsindikatoren zu entwickeln. Bereits etablierte membranständige Reporter zeigen eine vom Membranpotential abhängige Fluoreszenz auf und erlauben so das Auslesen veränderlicher Membranspannungen in Echtzeit. Dabei basieren die derzeit relevanten Spannungsindikatoren auf Weiterentwicklungen von Arch-3 (Hochbaum *et al.*, 2014; Piatkevich *et al.*, 2018). Mechanistische Untersuchungen an Arch-3 zeigten, dass das fluoreszierende Intermediat aus einer Photokonversion des N-Intermediates hervorgeht, wobei die Fluoreszenz durch Absorption eines zusätzlichen Photons initiiert wird (MacLaurin *et al.*, 2013). Ein analoges, als Q oder P490 bezeichnetes, fluoreszierendes Photointermediat wurde bereits für BR beschrieben (Popp *et al.*, 1993; Ohtani *et al.*, 1995, 1999). Aufgrund der ausgesprochen langen Lebensdauer der späten Photozyklusintermediate in CsR, kann davon ausgegangen werden, dass ein solches Q-analoges Intermediat leichter akkumuliert werden kann und so die Helligkeit des potentiellen Spannungsreporters gegenüber Arch-3-Derivaten erhöht wird. Die gegenüber Arch-3 erhöhte Spannungsabhängigkeit der Reprotonierung der RSB (Vogt *et al.*, 2015) könnte weiterhin eine bessere Skalierung der Fluoreszenz erlauben.

Ein anderes CsR-basiertes optogenetisches Werkzeug stellt der im Laufe dieser Arbeit entwickelte hochspezifische Protonenkanal CsR-Tyr14Glu dar. Dabei ist vor allem eine Anwendung zur Untersuchung physiologischer Eigenschaften von Zellorganellen in Abhängigkeit ihrer intraluminalen Protonenkonzentration denkbar. So zeigte sich etwa bei Untersuchungen an synaptischen Vesikeln, dass anders als bei Kanalrhodopsinvarianten, der funktionale Einbau von Arch-3 in die Vesikelmembran möglich war (Rost *et al.*, 2015). Als möglicher Grund wurden von den Autoren verschiedene Oligomerisierungszustände von Pumpen und Kanälen diskutiert, die ausschlaggebend für die Funktionalität sind. Da bei CsR-Tyr14Glu diesbezüglich keine Veränderung zum WT zu erwarten ist, kann es möglicherweise zur lichtinduzierten Auslöschung von pH-Gradienten an Membranen synaptischer Vesikel genutzt werden. Mitochondrien sind weitere Zellorganelle deren Physiologie maßgeblich durch pH-Gradienten reguliert wird. Bereits 1994 konnte demonstriert werden, dass sich BR heterolog in der inneren Membran von Mitochondrien einer Hefe exprimieren lässt (Hoffmann *et al.*, 1994). Kürzlich gelang auch die lichtinduzierte Entkopplung des pH-Gradienten an der mitochondrialen Membran und die damit verbundene Stilllegung des Membranpotentials durch die Expression von ChR2-Varianten mit einem verlangsamten Photozyklus (Tkatch *et al.*,



2017). Da ChR2 allerdings auch permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$  ist und  $\text{Ca}^{2+}$  einen essentiellen Einfluss auf die Physiologie der Mitochondrien hat, kann das protonenselektive CsR-Tyr14Glu eine bessere Unterscheidung zu  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Signalen ermöglichen. Ein weiterer Vorteil von CsR-Tyr14Glu gegenüber ChR2 ( $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ ; Stehfest and Hegemann, 2010) liegt in der um 55 nm bathochrom verschobenen Absorption. Da kurzwelliges Licht stärker durch Gewebe gestreut und absorbiert wird, erlaubt die Anregung mit Licht längerer Wellenlängen die Aktivierung in tieferen Gewebeschichten, was vor allem für *in vivo* Experimente relevant ist. Weiterhin könnte durch die Stabilisation des offenen Zustandes von CsR-Tyr14Glu das notwendige Anregungslicht reduziert und damit verbundene Strahlenschäden am Gewebe minimiert werden. Da der offene Zustand durch die späten Photozyklusintermediate repräsentiert wird, können durch etwaige Mutationen Übergangsgeschwindigkeiten dieser Photozyklusschritte moduliert und so die Dauer der Kanalöffnung verlängert werden. Der Vergleich mit BR zeigt, dass insbesondere Mutationen von Ile49 (Val49 in BR) und Leu94 (Leu93 in BR) in Frage kommen. Bei Mutationen dieser Reste in BR kam es zu einer verlängerten N-Lebensdauer, die durch eine verlangsamte Reisoomerisierung des Retinals erklärt wurde (Dioumaev *et al.*, 2001). Aber auch unter Zuhilfenahme der Ergebnisse elektrophysiologischer Untersuchungen an CsR-Arg83Gln lassen sich potentiell langsame CsR-Tyr14Glu Mutanten konzipieren. So gelang es beispielsweise durch eine zusätzliche Substitution des Met118 durch Threonin die Verschlusskinetik der CsR-Arg83Gln Mutante nach Beendigung der Belichtung stark zu verlangsamen (Vogt, 2017). Dieser Befund konnte auch bei der Doppelmutante CsR-Tyr14Glu/Met118Thr bestätigt werden, die bei pH 7,5 und -125 mV Haltespannung eine gegenüber dem parental CsR-Tyr14Glu um etwa zehnfach verlangsamte Abklingkinetik des Kanalstromes zeigt (private Mitteilung Dr. Arend Vogt, nicht gezeigt). Inwieweit die Mutation die Stabilität des Proteins beeinflusst, muss dabei noch untersucht werden.

Letztlich muss im Hinblick auf die Anwendung von CsR-Tyr14Glu als optogenetisches Werkzeug die bei pH < 8 beobachtete, residuale Pumpaktivität (vgl. Abs. 4.3) eliminiert werden. Da das Glutamat dabei in einer stark hydrophoben Kavität sitzt, könnte durch den Einbau polarer Gruppen der  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert gesenkt werden, so dass Glu14 auch unter physiologischen pH-Bedingungen deprotoniert vorliegt. Auf Grundlage der WT-Struktur können sinnvolle Mutationen durch elektrostatische Berechnungen vorhergesagt werden.

## 4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellte Kristallstruktur des CsR legt einzigartige Attribute offen, die es erlauben, beobachtete Besonderheiten des CsR strukturell zu legitimieren. Da jedoch in der Kombination mit den spektroskopischen Experimenten die Einflüsse eines externen elektrischen Feldes nicht eruiert werden konnten, ist es zwingend notwendig, etwaige Schlussfolgerungen durch elektrophysiologischen Messungen zu ergänzen. Gleichmaßen sollte in Zukunft der Versuch unternommen werden, spektroskopische Messungen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes, genauer einer Membranspannung, durchzuführen. Bereits 2008 wurden erste IR-spektroskopische Experimente an SRII in einem elektrischen Feld durchgeführt (Jiang *et al.*, 2008). Dabei wurde das Protein durch eine C-terminale Histidinsequenz an eine, auf einer Goldelektrode aufliegende, Ni-NTA-Schicht gebunden. Diese experimentell anspruchsvolle Methode ist jedoch durch die verfügbare Oberfläche limitiert, da nur eine Proteinschicht an der Oberfläche orientiert werden kann. Außerdem gab es seit dem Nachweis der Machbarkeit mit SRII keine Folgepublikationen zu anderen mikrobiellen Rhodopsinen, sodass die universelle Anwendbarkeit dieser Methode hinterfragt werden muss. Im Fall von lichtgetriebenen Protonenpumpen kann hingegen die intrinsische Eigenschaft des gerichteten Protonentransportes genutzt werden, um ein Membranpotential zu erzeugen. In einem möglichen Experiment könnte CsR in Vesikel rekonstituiert werden. Durch Belichtung würde es zu einem gerichteten Protonentransport kommen, der aufgrund der Impermeabilität der Vesikelmembran zum Aufbau eines elektrischen Gradienten (Membranpotential) führt. Fügt man in einem nächsten Schritt einen Protonophor (bspw. Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazob) hinzu und löst so das Membranpotential auf, kann aus der Differenz der Spektren der Einfluss des Membranpotentials auf das Protein beobachtet werden. Ein wichtiger Schritt in der Durchsetzung eines solchen Experimentes ist es, die gleiche Orientierung der Proteine in der Vesikelmembran sicherzustellen. Dabei können pH-abhängige Fluorophore wie beispielsweise pHluorin eine Sortierung mithilfe eines Fluoreszenz-Fluorssortierers (FACS, Englisch „*fluorescence activated cell-sorting*“) ermöglichen.

Weiterhin lassen die vielversprechenden initialen Tests zur Kristallisation der CsR-Tyr14Glu Mutante darauf hoffen, dass in naher Zukunft neben der WT- auch die Kristallstruktur dieser Mutante gelöst werden kann. Eine solche Kristallstruktur würde unser Verständnis von Pumpen und Kanälen weiter vertiefen. Ebenso sollten andere interessante Mutanten des CsR, die eine stabile Überexpression in HEK293-Zellen zeigen, wie beispielsweise CsR-Arg77Gln, für das Insektenzellsystem adaptiert werden, um initiale Kristallisationsscreens durchzuführen.

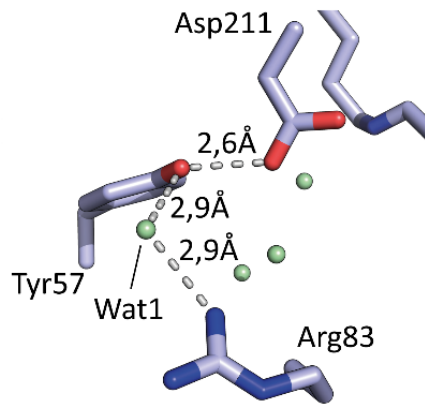
Letztlich sollte die hervorragende Expression des CsR im Hinblick auf die Anwendung

als optogenetisches Werkzeug ausgenutzt werden. Für den Einsatz als Hyperpolarisierungswerkzeug in Neuronen kommen Varianten mit einer reduzierten Spannungsabhängigkeit (CsR-Thr46Asn) in Frage. Neue Varianten könnten durch Substitution des His42 generiert werden. Für Anwendungen, die einen protonselektiven Kanal erfordern, muss CsR-Tyr14Glu weiterentwickelt werden und so die residuale Pumpaktivität unterbunden werden. Auch sollte überprüft werden, ob es gelingt, CsR als membranständigen Spannungssensor zu nutzen. Ergebnisse aus der Optimierung der Arch-3-basierten Spannungssensoren können dabei auf CsR angewendet werden.

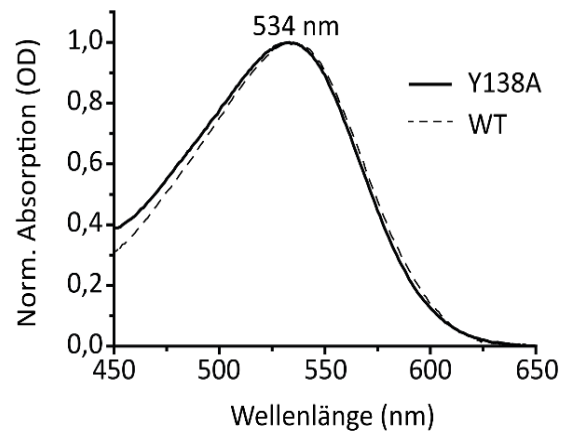
## 5 Appendix

**Tabelle A1** Datenaufzeichnung und Verfeinerungsstatistik. \*Werte in Klammern gelten für den Bereich mit der höchsten Auflösung. Die Tabelle wurde durch die Dr. Patrick Scheerer, AG Proteinstrukturanalyse/Kristallisation, Charité bereitgestellt, die sowohl die Kristalle vermessen als auch die Daten prozessiert und finalisiert hat.

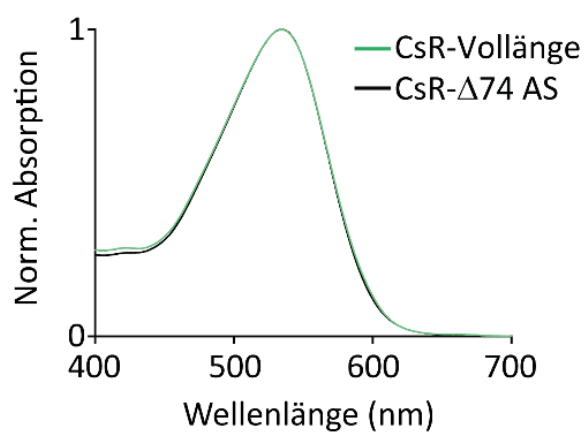
<b>Datenaufzeichnung</b>	
Strahlenquelle	ESRF, ID23-2
Wellenlänge (Å)	0,8729
Raumgruppe	H3
<b>Dimensionen der Einheitszelle</b>	
a, b, c (Å)	78,08, 78,08, 143,97
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 120
Auflösung (Å)	32,91 – 2,00 (2,05 – 2,00)*
$R_{merge}$	0,110 (1,391)*
$R_{p.i.m.}$	0,066 (0,901)*
CC1/2	0,997 (0,357)*
Vollständigkeit (%)	100,0 (100,0)*
Redundanz	4,4 (4,6)*
<b>Verfeinerungsstatistik</b>	
Auflösung (Å)	32,91 – 2,00
Anzahl der Reflexionen	20932
$R_{work}/R_{free}$ (%)	19,2/22,5
<b>Anzahl der Atome</b>	
Protein	1715
Ligand	118
Wasser	42
<b>Quadratisches Mittel</b>	
Bindungslängen (Å)	0,013
Bindungswinkel (°)	1,77



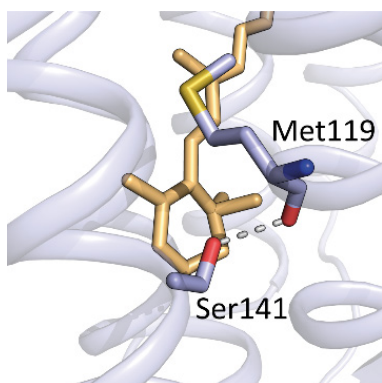
**Abbildung A1** Detaillierte Ansicht der Kopplung zwischen Arg 83 und Asp211 über Wasser 1 und Tyr57. Wasser sind durch grüne Kugeln dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen durch graue Striche. Abstände zwischen den Atomen sind eingezeichnet.



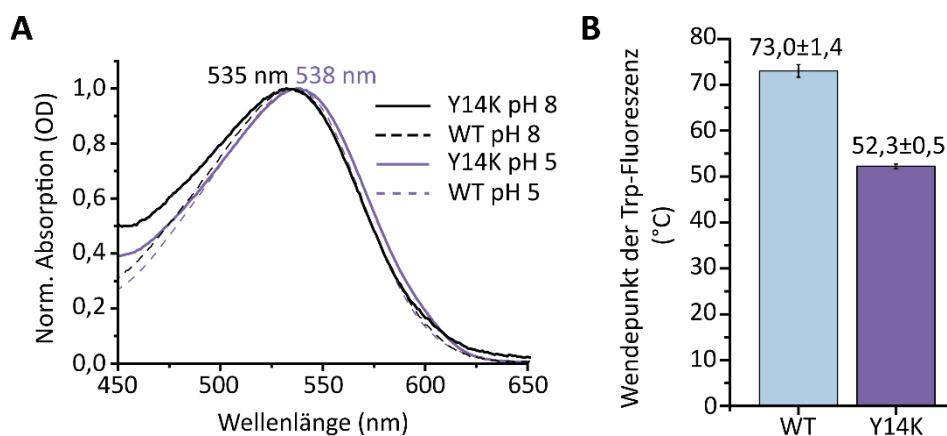
**Abbildung A2** Darstellung der normierten Absorptionsspektren des CsR-Tyr138Ala (durchgezogene Linie) und dem WT (gestrichelte Linie). Wellenlänge der maximalen Absorption des CsR-Tyr138Ala angegeben.



**Abbildung A3** Darstellung der normierten Absorptionsspektren des CsR-Volllänge (grün) und dem um 74 AS C-terminal verkürzten Konstruktes (schwarz).

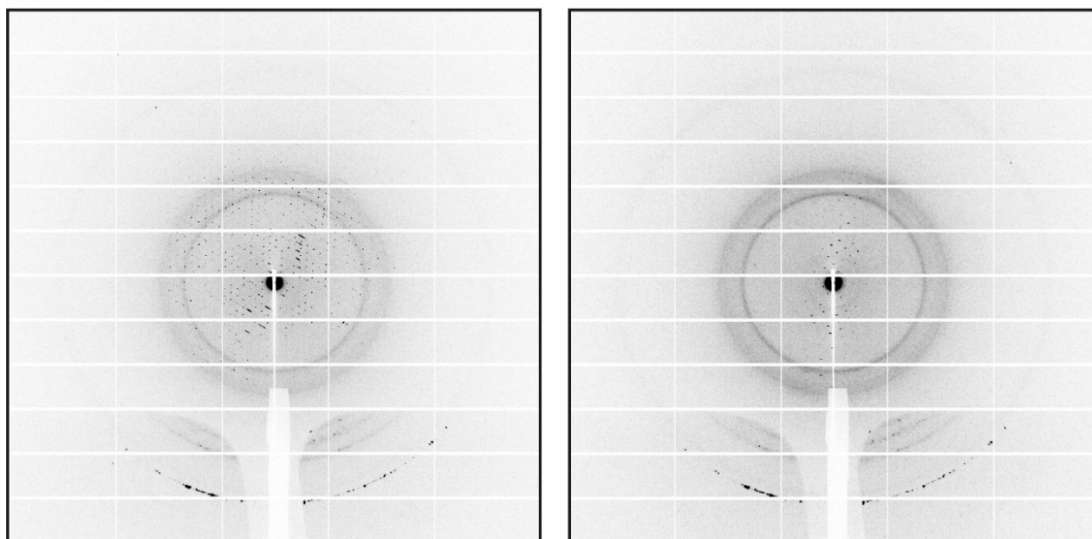


**Abbildung A4** Detailansicht der H-Brückenwechselwirkung zwischen Ser141 und dem Rückgratsauerstoff des Met119. Retinal in orange dargestellt.



**Abbildung A5 A** Darstellung der normierten Absorptionsspektren des CsR-Tyr14Lys (durchgezogene Linie) und dem WT (gestrichelte Linie) bei pH 8 (schwarz) und pH 5 (violett). Wellenlänge der maximalen Absorption des CsR-Tyr14Lys angegeben. **B** Temperaturwerte der Wendepunkte der beobachteten Tryptophanfluoreszenz bei CsR-WT (n=7) und CsR-Tyr14Glu (n=4).

#### CsR-Y14E



**Abbildung A6** Diffraktionsbilder eines CsR-Tyr14Glu Kristalles aus der Bedingung mit 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,2M NaCl in 0,1M HEPES pH 7,5. Detektiert an dem Messplatz ID-30B des ESRF, Grenoble, Frankreich mit einem DECTRIS PILATUS3 X 2M Detektors. Ringe dienen als Orientierung zur Charakterisierung der Streuqualität. Bilder zur Verfügung gestellt durch Michael Szczepek, AG Proteinstrukturanalyse/Kristallisation, Charité Berlin.

# Literaturverzeichnis

- Adams, P. D. *et al.* (2010) 'PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2), pp. 213–221. doi: 10.1107/S0907444909052925.
- Albarracín, V. H. *et al.* (2016) 'Functional Green-Tuned Proteorhodopsin from Modern Stromatolites', *PLOS ONE*. Edited by E. Kothe, 11(5), p. e0154962. doi: 10.1371/journal.pone.0154962.
- Altschul, S. F. *et al.* (1990) 'Basic local alignment search tool', *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Andersen, L. H. *et al.* (2005) 'Absorption of Schiff-Base Retinal Chromophores in Vacuo', *Journal of the American Chemical Society*, 127(35), pp. 12347–12350. doi: 10.1021/ja051638j.
- Asakawa, K., Masuda, S. and Takeuchi, H. (2006) 'Indole ring orientations of Trp189 in the ground and M intermediate states of bacteriorhodopsin as studied by polarized UV resonance Raman spectroscopy', *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(1–3), pp. 255–262. doi: 10.1002/jrs.1463.
- Avelar, G. M. *et al.* (2014) 'A Rhodopsin-Guanylyl Cyclase Gene Fusion Functions in Visual Perception in a Fungus', *Current Biology*. Elsevier, 24(11), pp. 1234–1240. doi: 10.1016/j.cub.2014.04.009.
- Baker, N. A. *et al.* (2001) 'Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), pp. 10037–10041. doi: 10.1073/pnas.181342398.
- Balashov, S. P. *et al.* (1990) 'The N intermediate of bacteriorhodopsin at low temperatures: Stabilization and photoconversion', *FEBS Letters*, 271(1–2), pp. 93–96. doi: 10.1016/0014-5793(90)80380-2.
- Balashov, S. P. *et al.* (1996) 'Titration of aspartate-85 in bacteriorhodopsin: what it says about chromophore isomerization and proton release', *Biophysical Journal*, 70(1), pp. 473–481. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79591-7.
- Balashov, S. P. *et al.* (1997) 'Glutamate-194 to Cysteine Mutation Inhibits Fast Light-Induced Proton Release in Bacteriorhodopsin', *Biochemistry*, 36(29), pp. 8671–8676. doi: 10.1021/bi970744y.
- Balashov, S. P. *et al.* (1999) 'The Proton Release Group of Bacteriorhodopsin Controls the Rate of the Final Step of Its Photocycle at Low pH', *Biochemistry*, 38(7), pp. 2026–2039. doi: 10.1021/bi981926a.
- Balashov, S. P. (2000) 'Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1460(1), pp. 75–94. doi: 10.1016/S0005-2728(00)00131-6.
- Balashov, S. P. *et al.* (2005) 'Xanthorhodopsin: A Proton Pump with a Light-Harvesting Carotenoid Antenna', *Science*, 309(5743), pp. 2061–2064. doi: 10.1126/science.1118046.
- Bamann, C. *et al.* (2008) 'Spectral Characteristics of the Photocycle of Channelrhodopsin-2 and Its Implication for Channel Function', *Journal of Molecular Biology*, 375(3), pp. 686–694. doi: 10.1016/j.jmb.2007.10.072.

- Bamann, C. *et al.* (2014) 'Proteorhodopsin', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(5), pp. 614–625. doi: 10.1016/j.bbabbio.2013.09.010.
- Beja, O. (2000) 'Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea', *Science*, 289(5486), pp. 1902–1906. doi: 10.1126/science.289.5486.1902.
- van den Berg, R. *et al.* (1990) 'Subpicosecond resonance Raman spectra of the early intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin', *Biophysical Journal*. Elsevier, 58(1), pp. 135–141. doi: 10.1016/S0006-3495(90)82359-6.
- Bergo, V. B. *et al.* (2009) 'His-75 in proteorhodopsin, a novel component in light-driven proton translocation by primary pumps.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 284(5), pp. 2836–43. doi: 10.1074/jbc.M803792200.
- Berndt, A. *et al.* (2009) 'Bi-stable neural state switches', *Nature Neuroscience*, 12(2), pp. 229–234. doi: 10.1038/nn.2247.
- Berndt, A. *et al.* (2014) 'Structure-guided Transformation of Channelrhodopsin into a Light-activated Chloride Channel', *Science*, 344(April), pp. 420–424. doi: 10.1126/science.
- Berthold, P. *et al.* (2008) 'Channelrhodopsin-1 Initiates Phototaxis and Photophobic Responses in Chlamydomonas by Immediate Light-Induced Depolarization', *The Plant Cell*, 20(6), pp. 1665–1677. doi: 10.1105/tpc.108.057919.
- Bezanilla, F. (2000) 'The voltage sensor in voltage-dependent ion channels', *Physiological reviews*, 80(2), pp. 555–92. doi: 10.1126/science.279.5349.403.
- Blanc, G. *et al.* (2012) 'The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation', *Genome Biology*. BioMed Central Ltd, 13(5), p. R39. doi: 10.1186/gb-2012-13-5-r39.
- Boeuf, D. *et al.* (2016) 'Summer Abundance and Distribution of Proteorhodopsin Genes in the Western Arctic Ocean', *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2016.01584.
- Bogomolni, R. A. and Spudich, J. L. (1982) 'Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(20), pp. 6250–6254. doi: 10.1073/pnas.79.20.6250.
- Boyden, E. S. *et al.* (2005) 'Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity', *Nature Neuroscience*, 8(9), pp. 1263–1268. doi: 10.1038/nn1525.
- Braiman, M. and Mathies, R. (1982) 'Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsin's primary photoproduct: evidence for a distorted 13-*cis* retinal chromophore', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(2), pp. 403–407. doi: 10.1073/pnas.79.2.403.
- Braiman, M. S. *et al.* (1988) 'Vibrational Spectroscopy of Bacteriorhodopsin Mutants: Light-Driven Proton Transport Involves Protonation Changes of Aspartic Acid Residues 85, 96, and 212f', *Biochemistry*, 27, pp. 8516–8520.
- Braiman, M. S., Bousche, O. and Rothschild, K. J. (1991) 'Protein dynamics in the bacteriorhodopsin photocycle: submillisecond Fourier transform infrared spectra of the L, M, and N photointermediates.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6), pp. 2388–2392. doi: 10.1073/pnas.88.6.2388.
- Brown, L. (2001) 'Proton transport mechanism of bacteriorhodopsin as revealed by site-specific mutagenesis and protein sequence variability.', *Biochemistry. Biokhimiia*, 66(11), pp. 1249–55.



- Brown, L. S. *et al.* (1993) 'Estimated acid dissociation constants of the Schiff base, Asp-85, and Arg-82 during the bacteriorhodopsin photocycle', *Biophysical Journal*. Elsevier, 65(1), pp. 124–130. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81064-6.
- Brown, L. S. *et al.* (1995) 'Glutamic acid 204 is the terminal proton release group at the extracellular surface of bacteriorhodopsin', *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), pp. 27122–27126. doi: 10.1074/jbc.270.45.27122.
- Brown, L. S. *et al.* (1998) 'Connectivity of the retinal Schiff base to Asp85 and Asp96 during the bacteriorhodopsin photocycle: the local-access model', *Biophysical Journal*. Elsevier, 75(3), pp. 1455–1465. doi: 10.1016/S0006-3495(98)74064-0.
- Brown, L. S. *et al.* (1998) 'Local-Access Model for Proton Transfer in Bacteriorhodopsin', *Biochemistry*, 37(11), pp. 3982–3993. doi: 10.1021/bi9728396.
- Brown, L. S. (2014) 'Proton-Pumping Microbial Rhodopsins – Ubiquitous Structurally Simple Helpers of Respiration and Photosynthesis', in *The Structural Basis of Biological Energy Generation*, 21 *Advances in Photosynthesis and Respiration* 39, pp. 1–20. doi: DOI 10.1007/978-94-017-8742-0\_1.
- Brown, L. S. and Lanyi, J. K. (1996) 'Determination of the transiently lowered pKa of the retinal Schiff base during the photocycle of bacteriorhodopsin.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), pp. 1731–1734. doi: 10.1073/pnas.93.4.1731.
- Caffrey, M. (2015) 'A comprehensive review of the lipid cubic phase or in meso method for crystallizing membrane and soluble proteins and complexes', *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. International Union of Crystallography, 71, pp. 3–18. doi: 10.1107/S2053230X14026843.
- Caffrey, M., Li, D. and Dukupati, A. (2012) 'Membrane Protein Structure Determination Using Crystallography and Lipidic Mesophases: Recent Advances and Successes', *Biochemistry*, 51(32), pp. 6266–6288. doi: 10.1021/bi300010w.
- Cao, Y. *et al.* (1993) 'Relationship of Proton Release at the Extracellular Surface to Deprotonation of the Schiff Base in the Bacteriorhodopsin Photocycle', *Biophysical Journal*. Elsevier, 68(4), pp. 1518–1530. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80324-3.
- Cao, Z. and Bowie, J. U. (2012) 'Shifting hydrogen bonds may produce flexible transmembrane helices', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), pp. 8121–8126. doi: 10.1073/pnas.1201298109.
- Chan, S. K. *et al.* (2014) 'Crystal Structure of Cruxrhodopsin-3 from *Haloarcula vallismortis*', *PLoS ONE*. Edited by K. Zeth, 9(9), p. e108362. doi: 10.1371/journal.pone.0108362.
- Checover, S. *et al.* (2001) 'Dynamics of the Proton Transfer Reaction on the Cytoplasmic Surface of Bacteriorhodopsin', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi002574m.
- Chen, M. and Blankenship, R. E. (2011) 'Expanding the solar spectrum used by photosynthesis', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 16(8), pp. 427–431. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.011.
- Chizhov, I. *et al.* (1996) 'Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle', *Biophysical Journal*. Cell Press, 71(5), pp. 2329–2345. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79475-4.
- Chow, B. Y. *et al.* (2010) 'High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps', *Nature*, 463(7277), pp. 98–102. doi: 10.1038/nature08652.
- Corcoran, T. C., Dupuis, P. and El-Sayed, M. A. (1986) 'THE EFFECT OF IONIC STRENGTH AND pH ON THE PROTONATED SCHIFF BASE AND TYROSINE DEPROTONATION KINETICS

DURING THE BACTERIORHODOPSIN PHOTOCYCLE', *Photochemistry and Photobiology*, 43(6), pp. 655–660. doi: 10.1111/j.1751-1097.1986.tb05642.x.

Dancsházy, Z. and Karvaly, B. (1976) 'Incorporation of bacteriorhodopsin into a bilayer lipid membrane; a photoelectric-spectroscopic study', *FEBS Letters*, 72(1), pp. 136–138. doi: 10.1016/0014-5793(76)80829-0.

Decoursey, T. E. (2003) 'Voltage-Gated Proton Channels and Other Proton Transfer Pathways', *Physiological Reviews*, 83(2), pp. 475–579. doi: 10.1152/physrev.00028.2002.

Deisseroth, K. (2011) 'Optogenetics', *Nature Methods*, 8(1), pp. 26–29. doi: 10.1038/nmeth.f.324.

Deisseroth, K. (2015) 'Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience', *Nature Neuroscience*, 18(9), pp. 1213–1225. doi: 10.1038/nn.4091.

Deisseroth, K. and Hegemann, P. (2017) 'The form and function of channelrhodopsin', *Science*, 357(6356), p. eaan5544. doi: 10.1126/science.aan5544.

Dioumaev, A. K. *et al.* (1999) 'Fourier transform infrared spectra of a late intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle suggest transient protonation of Asp-212', *Biochemistry*, 38(31), pp. 10070–10078. doi: 10.1021/bi990873+.

Dioumaev, A. K. *et al.* (2001) 'Coupling of the Reisoimerization of the Retinal, Proton Uptake, and Reprotonation of Asp-96 in the N Photointermediate of Bacteriorhodopsin', *Biochemistry*, 40(38), pp. 11308–11317. doi: 10.1021/bi011027d.

Dioumaev, A. K. *et al.* (2002) 'Proton Transfers in the Photochemical Reaction Cycle of Proteorhodopsin', *Biochemistry*, 41(17), pp. 5348–5358. doi: 10.1021/bi025563x.

Dobler, J. *et al.* (1988) 'Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy', *Chemical Physics Letters*, 144(2), pp. 215–220. doi: 10.1016/0009-2614(88)87120-3.

Drachev, L. A. *et al.* (1974) 'Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H<sup>+</sup>-ATPase and bacteriorhodopsin.', *Nature*, 249, pp. 321–323.

Drachev, L. A. *et al.* (1987) 'The mechanism of H<sup>+</sup> transfer by bacteriorhodopsin The properties and the function of intermediate P', *FEBS Letters*, 226(1), pp. 139–144. doi: 10.1016/0014-5793(87)80567-7.

Drachev, L. A., Kaulen, A. D. and Skulachev, V. P. (1978) 'Time resolution of the intermediate steps in the bacteriorhodopsin-linked electrogenesis', *FEBS Letters*, 87(1), pp. 161–167. doi: 10.1016/0014-5793(78)80157-4.

Dudev, T. *et al.* (2015) 'Selectivity Mechanism of the Voltage-gated Proton Channel , H V 1', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, (February), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep10320.

Dunach, M. *et al.* (1990) 'Uv-visible spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: substitution of Arg-82, Asp-85, Tyr-185, and Asp-212 results in abnormal light-dark adaptation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), pp. 9873–9877. doi: 10.1073/pnas.87.24.9873.

Edman, K. *et al.* (1999) 'High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle', *Nature*, 401, pp. 822–825.

Edman, K. *et al.* (2004) 'Deformation of Helix C in the Low Temperature L-intermediate of Bacteriorhodopsin', *Journal of Biological Chemistry*, 279(3), pp. 2147–2158. doi: 10.1074/jbc.M300709200.

- El-Gaby, M. *et al.* (2016) 'Archaerhodopsin Selectively and Reversibly Silences Synaptic Transmission through Altered pH', *Cell Reports*. Elsevier Company., 16(8), pp. 2259–2268. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.057.
- Elazar, A. *et al.* (2016) 'Interplay between hydrophobicity and the positive-inside rule in determining membrane-protein topology', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(37), pp. 10340–10345. doi: 10.1073/pnas.1605888113.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) 'Coot: Model-building tools for molecular graphics', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 60(12 I), pp. 2126–2132. doi: 10.1107/S0907444904019158.
- Engqvist, M. K. M. *et al.* (2015) 'Directed Evolution of *Gloeobacter violaceus* Rhodopsin Spectral Properties', *Journal of Molecular Biology*, 427(1), pp. 205–220. doi: 10.1016/j.jmb.2014.06.015.
- Ernst, O. P. *et al.* (2014) 'Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms', *Chemical Reviews*, 114(1), pp. 126–163. doi: 10.1021/cr4003769.
- Evans, P. (2006) 'Scaling and assessment of data quality', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 62(1), pp. 72–82. doi: 10.1107/S0907444905036693.
- Evans, P. R. and Murshudov, G. N. (2013) 'How good are my data and what is the resolution?', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 69(7), pp. 1204–1214. doi: 10.1107/S0907444913000061.
- Feng, Y. *et al.* (1994) 'Probing of the Retinal Binding Site of Bacteriorhodopsin by Affinity Labeling', *Biochemistry*, 33(38), pp. 11624–11630. doi: 10.1021/bi00204a025.
- Fisher, Z. *et al.* (2005) 'Structural and kinetic characterization of active-site histidine as a proton shuttle in catalysis by human carbonic anhydrase II', *Biochemistry*, 44(4), pp. 1097–1105. doi: 10.1021/bi0480279.
- Fodor, S. P. A. *et al.* (1988) 'Chromophore Structure In Bacteriorhodopsin'S N Intermediate: Implications For The Proton-pumping Mechanism', *Biochemistry*, 27(18), pp. 7097–7101. doi: 10.1021/bi00418a064.
- Freedman, K. A. and Becker, R. S. (1986) 'Comparative Investigation of the Photoisomerization of the Protonated and Unprotonated n-Butylamine Schiff Bases of 9-cis-, 11-cis-, 13-cis-, and all-trans-Retinals', *Journal of the American Chemical Society*, 108(6), pp. 1245–1251. doi: 10.1021/ja00266a020.
- Freier, E., Wolf, S. and Gerwert, K. (2011) 'Proton transfer via a transient linear water-molecule chain in a membrane protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), pp. 11435–11439. doi: 10.1073/pnas.1104735108.
- Friedman, N. *et al.* (1994) 'On the heterogeneity of the M population in the photocycle of bacteriorhodopsin', *Biochemistry*, 33(49), pp. 14758–14767. doi: 10.1021/bi00253a014.
- Friedrich, T. *et al.* (2002) 'Proteorhodopsin is a Light-driven Proton Pump with Variable Vectoriality', *Journal of Molecular Biology*, 321, pp. 821–838. doi: 10.1016/S0022283602006964.
- Furuse, M. *et al.* (2015) 'Structural basis for the slow photocycle and late proton release in *Acetabularia* rhodopsin I from the marine plant *Acetabularia acetabulum*', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 71, pp. 2203–2216. doi: 10.1107/S1399004715015722.

- Gadsby, D. C. (2009) 'Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), pp. 344–352. doi: 10.1038/nrm2668.
- Garcia-Martinez, J. *et al.* (2015) 'The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination', *Scientific Reports*, 5, pp. 1–11. doi: 10.1038/srep07798.
- Garczarek, F. *et al.* (2005) 'Proton binding within a membrane protein by a protonated water cluster', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(10), pp. 3633–3638. doi: 10.1073/pnas.0500421102.
- Garczarek, F. and Gerwert, K. (2006) 'Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy', *Nature*, 439(7072), pp. 109–112. doi: 10.1038/nature04231.
- Geibel, S. *et al.* (2001) 'The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior', *Biophysical Journal*. Elsevier, 81(4), pp. 2059–2068. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75855-9.
- Geibel, S. *et al.* (2013) 'Voltage Dependence of Proton Pumping by Bacteriorhodopsin Mutants with Altered Lifetime of the M Intermediate', *PLoS ONE*. Edited by R. Tuma, 8(9), p. e73338. doi: 10.1371/journal.pone.0073338.
- Gerwert, K., Freier, E. and Wolf, S. (2014) 'The role of protein-bound water molecules in microbial rhodopsins', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. The Authors., 1837(5), pp. 606–613. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.09.006.
- Govindjee, R. *et al.* (1996) 'Arginine-82 Regulates the PKa of the Group Responsible for the Light-Driven Proton Release in Bacteriorhodopsin', *Biophysical Journal*. Elsevier, 71(2), pp. 1011–1023. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79302-5.
- Govorunova, E. G. *et al.* (2015) 'Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics', *Science*, 349(6248), pp. 647–651.
- Govorunova, E. G. *et al.* (2017) 'Microbial Rhodopsins: Diversity, Mechanisms, and Optogenetic Applications', *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), pp. 845–872. doi: 10.1146/annurev-biochem-101910-144233.
- Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A. and Spudich, J. L. (2016) 'Structurally Distinct Cation Channelrhodopsins from Cryptophyte Algae', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 110(11), pp. 2302–2304. doi: 10.1016/j.bpj.2016.05.001.
- Greenhalgh, D. A. *et al.* (1993) 'Hydrophobic Amino Acids in the Retinal-binding Pocket of Bacteriorhodopsin', *The Journal of Biological Chemistry*, 268(27), pp. 20305–20311.
- Grzesiek, S. and Dencher, N. A. (1986) 'Time-course and stoichiometry of light-induced proton release and uptake during the photocycle of bacteriorhodopsin', *FEBS Letters*, 208(2), pp. 337–342. doi: 10.1016/0014-5793(86)81045-6.
- Gushchin, I. *et al.* (2013) 'Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria, " Correction for " Sulfatides are required for renal adaptation to chronic metabolic acidosis, " by', *Proc Natl Acad Sci*, 31110110(10).
- Gushchin, I. *et al.* (2015) 'Crystal structure of a light-driven sodium pump', *Nature Structural & Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 22(5), pp. 390–395. doi: 10.1038/nsmb.3002.
- Gushchin, I. and Gordeliy, V. (2018) 'Microbial Rhodopsins', in Fersht, A. R. (ed.) *Protein Science Encyclopedia*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 19–56.

doi: 10.1002/9783527610754.

Hagedorn, R., Gradmann, D. and Hegemann, P. (2008) 'Dynamics of voltage profile in enzymatic ion transporters, demonstrated in electrokinetics of proton pumping rhodopsin', *Biophysical Journal*. Elsevier, 95(11), pp. 5005–5013. doi: 10.1529/biophysj.107.125260.

Haldrup, A., Naver, H. and Scheller, H. V. (1999) 'The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic Arabidopsis plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I', *Plant Journal*, 17(6), pp. 689–698. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00419.x.

Han, X. *et al.* (2011) 'A High-Light Sensitivity Optical Neural Silencer: Development and Application to Optogenetic Control of Non-Human Primate Cortex', *Frontiers in Systems Neuroscience*. Frontiers, 5, p. 18. doi: 10.3389/fnsys.2011.00018.

Harbison, G. S. *et al.* (1984) 'Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-cis, 15-syn and all-trans, 15-anti retinal Schiff bases.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(6), pp. 1706–1709. doi: 10.1073/pnas.81.6.1706.

Hasemi, T. *et al.* (2016) 'Characterization of a Cyanobacterial Chloride-pumping Rhodopsin and Its Conversion into a Proton Pump.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 291(1), pp. 355–62. doi: 10.1074/jbc.M115.688614.

Hashimoto, S. *et al.* (1997) 'Ultraviolet resonance Raman spectra of Trp-182 and Trp-189 in bacteriorhodopsin: Novel information on the structure of Trp-182 and its steric interaction with retinal', *Biochemistry*, 36(39), pp. 11583–11590. doi: 10.1021/bi971404f.

Heberle, J. *et al.* (2000) 'Bacteriorhodopsin: the functional details of a molecular machine are being resolved', *Biophysical Chemistry*, 85(2–3), pp. 229–248. doi: 10.1016/S0301-4622(99)00154-4.

Heberle, J. and Dencher, N. A. (1992) 'Surface-bound optical probes monitor protein translocation and surface potential changes during the bacteriorhodopsin photocycle.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(13), pp. 5996–6000. doi: 10.1073/pnas.89.13.5996.

Hegemann, P., Ehlenbeck, S. and Gradmann, D. (2005) 'Multiple photocycles of channelrhodopsin', *Biophysical Journal*. Elsevier, 89(6), pp. 3911–3918. doi: 10.1529/biophysj.105.069716.

Hempelmann, F. *et al.* (2011) 'His75–Asp97 Cluster in Green Proteorhodopsin', *Journal of the American Chemical Society*, 133(12), pp. 4645–4654. doi: 10.1021/ja111116a.

Henderson, R. and Unwin, P. (1975) 'Three-dimensional model of purple membrane by electron microscopy', *Nature*, 257(5521), pp. 28–32.

Herbst, J., Heyne, K. and Diller, R. (2002) 'Femtosecond Infrared Spectroscopy of Bacteriorhodopsin Chromophore Isomerization', *Science*, 297(5582), pp. 822–825. doi: 10.1126/science.1072144.

Hildebrandt, P. and Stockburger, M. (1984) 'Role of Water in Bacteriorhodopsin's Chromophore: Resonance Raman Study', *Biochemistry*, 23(23), pp. 5539–5548. doi: 10.1021/bi00318a025.

Ho, B. K. and Gruswitz, F. (2008) 'HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures', *BMC Structural Biology*, 8(1), p. 49. doi: 10.1186/1472-6807-8-49.

Hochbaum, D. R. *et al.* (2014) 'All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins', *Nature Methods*, 11(8), pp. 825–833. doi:

10.1038/nmeth.3000.

Hoffmann, A. *et al.* (1994) 'Photoactive mitochondria: in vivo transfer of a light-driven proton pump into the inner mitochondrial membrane of *Schizosaccharomyces pombe*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(20), pp. 9367–9371. doi: 10.1073/pnas.91.20.9367.

Hofmann, G. *et al.* (2015) 'Near-shore Antarctic pH variability has implications for the design of ocean acidification experiments', *Scientific Reports*, 5, pp. 1–10. doi: 10.1038/srep09638.

Hofrichter, J., Henry, E. R. and Lozier, R. H. (1989) 'Photocycles of bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted purple membrane studied by time-resolved absorption spectroscopy', *Biophysical Journal*. Elsevier, 56(4), pp. 693–706. doi: 10.1016/S0006-3495(89)82716-X.

Holm-Hansen, O. (1964) 'Isolation and Culture of Terrestrial and Fresh-water Algae of Antarctica', *Phycologia*, 4(1), pp. 44–51.

Hooft, R. W. W., Sander, C. and Vriend, G. (1996) 'Verification of Protein Structures: Side-Chain Planarity', *Journal of Applied Crystallography*. International Union of Crystallography, 29(6), pp. 714–716. doi: 10.1107/S0021889896008631.

Hu, J. *et al.* (2006) 'Histidines, heart of the hydrogen ion channel from influenza A virus: Toward an understanding of conductance and proton selectivity', 103(18), pp. 6865–6870.

Hu, J. G. *et al.* (1997) 'The Predischarge Chromophore in Bacteriorhodopsin: A 15 N Solid-State NMR Study of the L Photointermediate', *Biochemistry*, 36(31), pp. 9316–9322. doi: 10.1021/bi970416y.

Ihara, K. *et al.* (1985) 'Met-145 Is a Key Residue in the Dark Adaptation of Bacteriorhodopsin Homologs', *Biophysical Journal*, 67(Composition of retinal isomers in three proton pumps (bacteriorhodopsin, archaerhodopsin-1, and archaerhodopsin-2) was determined by high performance liquid chromatography in their light-adapted and dark-adapted states. In the light-adapted state, more t), pp. 1187–1191. doi: 10.1109/TPAS.1985.319172.

Inoue, K. *et al.* (2013) 'A light-driven sodium ion pump in marine bacteria', *Nature Communications*, 4, p. 1678. doi: 10.1038/ncomms2689.

Inoue, K. *et al.* (2016) 'A natural light-driven inward proton pump', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, p. 13415. doi: 10.1038/ncomms13415.

Inoue, K., Nomura, Y. and Kandori, H. (2016) 'Asymmetric Functional Conversion of Eubacterial Light-driven Ion Pumps', *Journal of Biological Chemistry*, 291(19), pp. 9883–9893. doi: 10.1074/jbc.M116.716498.

Ishizuka, T. *et al.* (2006) 'Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels', *Neuroscience Research*, 54(2), pp. 85–94. doi: 10.1016/j.neures.2005.10.009.

Jenkins, N., Parekh, R. B. and James, D. C. (1996) 'Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry', *Nature Biotechnology*, 14(8), pp. 975–981. doi: 10.1038/nbt0896-975.

Jiang, X. *et al.* (2008) 'Resolving voltage-dependent structural changes of a membrane photoreceptor by surface-enhanced IR difference spectroscopy.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), pp. 12113–7. doi: 10.1073/pnas.0802289105.

Jin, M. *et al.* (2005) 'Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium', *Cell*, 122(3), pp. 449–459. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.042.

Jung, K.-H., Trivedi, V. D. and Spudich, J. L. (2003) 'Demonstration of a sensory rhodopsin in

- eubacteria', *Molecular Microbiology*, 47(6), pp. 1513–1522. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03395.x.
- Kabsch, W. (2010) 'Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 66(2), pp. 133–144. doi: 10.1107/S0907444909047374.
- Kalani, M. R. *et al.* (2013) 'Characterizing a Histidine Switch Controlling pH-Dependent Conformational Changes of the Influenza Virus Hemagglutinin', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 105(4), pp. 993–1003. doi: 10.1016/j.bpj.2013.06.047.
- Kandori, H. (2015) 'Ion-pumping microbial rhodopsins', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(52). doi: 10.3389/fmolb.2015.00052.
- Kandt, C., Schlitter, J. and Gerwert, K. (2004) 'Dynamics of Water Molecules in the Bacteriorhodopsin Trimer in Explicit Lipid/Water Environment', *Biophysical Journal*, 86(2), pp. 705–717. doi: 10.1016/S0006-3495(04)74149-1.
- Kato, H. E. *et al.* (2012) 'Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel', *Nature*, 482. doi: 10.1038/nature10870.
- Kato, H. E., Kamiya, M., *et al.* (2015) 'Atomistic design of microbial opsin-based blue-shifted optogenetics tools', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 7177. doi: 10.1038/ncomms8177.
- Kato, H. E., Inoue, K., *et al.* (2015) 'Structural basis for Na<sup>+</sup> transport mechanism by a light-driven Na<sup>+</sup> pump', *Nature*, 521(7550), pp. 48–53. doi: 10.1038/nature14322.
- Keszthelyi, L. and Ormos, P. (1980) 'Electric signals associated with the photocycle of bacteriorhodopsin', *FEBS Letters*, 109(2), pp. 189–193. doi: 10.1016/0014-5793(80)81083-0.
- Kikukawa, T. *et al.* (2011) 'Photochemistry of Acetabularia Rhodopsin II from a Marine Plant, *Acetabularia acetabulum*', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi2009932.
- Kim, K. *et al.* (2016) 'Crystal structure and functional characterization of a light-driven chloride pump having an NTQ motif', *Nature Communications*, 7, p. 12677. doi: 10.1038/ncomms12677.
- Konno, M. *et al.* (2016) 'Mutant of a Light-Driven Sodium Ion Pump Can Transport Cesium Ions', *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(1), pp. 51–55. doi: 10.1021/acs.jpclett.5b02385.
- Kouyama, T. *et al.* (2004) 'Crystal Structure of the L Intermediate of Bacteriorhodopsin : Evidence for Vertical Translocation of a Water Molecule during the Proton Pumping Cycle', pp. 531–546. doi: 10.1016/j.jmb.2003.10.068.
- Kouyama, T. *et al.* (2014) 'Structure of archaerhodopsin-2 at 1.8 Å resolution', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 70(10), pp. 2692–2701. doi: 10.1107/S1399004714017313.
- Koyanagi, M. *et al.* (2004) 'Bistable UV pigment in the lamprey pineal', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17), pp. 6687–6691. doi: 10.1073/pnas.0400819101.
- Kralj, J. M. *et al.* (2011) 'Electrical Spiking in *Escherichia coli* Probed with a Fluorescent Voltage-Indicating Protein', *Science*, 333(6040), pp. 345–348. doi: 10.1126/science.1204831.
- Krause, B. S. *et al.* (2017) 'Complex Photochemistry within the Green-Absorbing Channelrhodopsin ReaChR', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 112(6), pp. 1166–1175. doi: 10.1016/j.bpj.2017.02.001.

- Landau, E. M. and Rosenbusch, J. P. (1996) 'Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), pp. 14532–14535. doi: 10.1073/pnas.93.25.14532.
- Lanyi, J. K. and Schobert, B. (2004) 'Local–Global Conformational Coupling in a Heptahelical Membrane Protein: Transport Mechanism from Crystal Structures of the Nine States in the Bacteriorhodopsin Photocycle', *Biochemistry*, 43(1), pp. 3–8. doi: 10.1021/bi035843s.
- Larkin, M. A. *et al.* (2007) 'Clustal W and Clustal X version 2.0', *Bioinformatics*, 23(21), pp. 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Laskowski, R. A. *et al.* (1993) 'PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures', *Journal of Applied Crystallography*. International Union of Crystallography, 26(2), pp. 283–291. doi: 10.1107/S0021889892009944.
- Lee, K. A. *et al.* (2015) 'Mistic-fused expression of algal rhodopsins in Escherichia coli and its photochemical properties', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., 1850(9), pp. 1694–1703. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.04.002.
- Lee, T. Y. *et al.* (2015) 'Tuning the Photocycle Kinetics of Bacteriorhodopsin in Lipid Nanodiscs', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 109(9), pp. 1899–1906. doi: 10.1016/j.bpj.2015.09.012.
- Lettau, E. (2018) *Untersuchung des Protonenaufnahmemechanismus der lichtaktivierten Pumpe CsR*. Humboldt Universität zu Berlin.
- Li, X. *et al.* (2005) 'Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49), pp. 17816–17821. doi: 10.1073/pnas.0509030102.
- Logunov, S. L., El-Sayed, M. A. and Lanyi, J. K. (1996) 'Replacement Effects of Neutral Amino Acid Residues of Different Molecular Volumes in the Retinal Binding Cavity of Bacteriorhodopsin on the Dynamics of Its Primary Process', *Biophysical Journal*, 70, pp. 2875–2881. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79857-0.
- Lomize, M. A. *et al.* (2012a) 'OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes', *Nucleic Acids Research*, 40(D1), pp. D370–D376. doi: 10.1093/nar/gkr703.
- Lomize, M. A. *et al.* (2012b) 'OPM database and PPM web server: Resources for positioning of proteins in membranes', *Nucleic Acids Research*, 40(D1), pp. 370–376. doi: 10.1093/nar/gkr703.
- Long, S. B. *et al.* (2007) 'Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment', *Nature*, 450(7168), pp. 376–382. doi: 10.1038/nature06265.
- Lorenz-Fonfria, V. A. *et al.* (2017) 'pH-sensitive vibrational probe reveals a cytoplasmic protonated cluster in bacteriorhodopsin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201707993. doi: 10.1073/pnas.1707993114.
- Lörinczi, É. *et al.* (2009) 'Voltage- and pH-Dependent Changes in Vectoriality of Photocurrents Mediated by Wild-type and Mutant Proteorhodopsins upon Expression in Xenopus Oocytes', *Journal of Molecular Biology*, 393(2), pp. 320–341. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.055.
- Lovell, S. C. *et al.* (2003) 'Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation', *Proteins-Structure Function and Genetics*, 50(August 2002), pp. 437–450. doi: 10.1002/prot.10286.
- Lozier, R. H. *et al.* (1976) 'Kinetics and Stoichiometry of Light-Induced Proton Release and



- Uptake from Purple Membrane Fragments, *Halobacterium Halobium* Cell Envelopes, and Phospholipid Vesicles Containing Oriented Purple Membrane', *Biochimica et Biophysica Acta*, 440, pp. 545–556.
- Lozier, R. H., Bogomolni, R. A. and Stoeckenius, A. (1975) 'Bacteriorhodopsin: A Light-Driven Proton Pump in *Halobacterium Halobium*', *Biophysical Journal*, 15, pp. 955–962. doi: 10.1016/S0006-3495(75)85875-9.
- Lu, M. *et al.* (2000) 'Evidence for the rate of the final step in the bacteriorhodopsin photocycle being controlled by the proton release group: R134H mutant', *Biochemistry*, 39(9), pp. 2325–2331. doi: 10.1021/bi992554o.
- Luck, M. *et al.* (2012) 'A Photochromic Histidine Kinase Rhodopsin (HKR1) That Is Bimodally Switched by Ultraviolet and Blue Light', *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), pp. 40083–40090. doi: 10.1074/jbc.M112.401604.
- Luck, M. and Hegemann, P. (2017) 'The two parallel photocycles of the *Chlamydomonas* sensory photoreceptor histidine kinase rhodopsin 1', *Journal of Plant Physiology*. Elsevier, 217(May), pp. 77–84. doi: 10.1016/j.jplph.2017.07.008.
- Ludmann, K., Gergely, C. and Váró, G. (1998) 'Kinetic and Thermodynamic Study of the Bacteriorhodopsin Photocycle over a Wide pH Range', *Biophysical Journal*, 75(6), pp. 3110–3119. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77752-5.
- Luecke, H. *et al.* (1999) 'Structural Changes in Bacteriorhodopsin During Ion Transport at Angstrom Resolution', *Science*, 286(5438), pp. 255–260. doi: 10.1126/science.286.5438.255.
- Luecke, H. *et al.* (1999) 'Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution', *Journal of Molecular Biology*, 291(4), pp. 899–911. doi: 10.1006/jmbi.1999.3027.
- Luecke, H. *et al.* (2008) 'Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 105(43), pp. 16561–16565. doi: 10.1073/pnas.0807162105.
- Lutz, I. *et al.* (2001) 'Primary reactions of sensory rhodopsins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), pp. 962–967. doi: 10.1073/pnas.021560298.
- Mackin, K. A., Roy, R. A. and Theobald, D. L. (2014) 'An Empirical Test of Convergent Evolution in Rhodopsins', *Molecular Biology and Evolution*, 31(1), pp. 85–95. doi: 10.1093/molbev/mst171.
- Maclaurin, D. *et al.* (2013) 'Mechanism of voltage-sensitive fluorescence in a microbial rhodopsin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), pp. 5939–5944. doi: 10.1073/pnas.1215595110.
- Maeda, A. *et al.* (1991) 'Fourier Transform Infrared Spectral Studies on the Schiff Base Mode of All-*trans* Bacteriorhodopsin and its Photointermediates, K and L', *Photochemistry and Photobiology*, 54(6), pp. 911–921. doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02111.x.
- Maeda, A., Iwasa, T. and Sakyo-ku, F. (1977) 'Isomeric Composition of Retinal Chromophore in Dark-Adapted Bacteriorhodopsin', *J Biochem*, 82(6), pp. 1599–1604.
- Mahn, M. *et al.* (2016) 'Biophysical constraints of optogenetic inhibition at presynaptic terminals', *Nature Neuroscience*, 19(4), pp. 554–556. doi: 10.1038/nn.4266.
- Marti, T. *et al.* (1991) 'Bacteriorhodopsin Mutants Containing Single Substitutions of Serine or Threonine Residues Are All Active in Proton Translocation', *The Journal of Biological Chemistry*, 266(11), pp. 6919–6927.
- Mathies, R. and Stryer, L. (1976) 'Retinal has a highly dipolar vertically excited singlet state:

- Implications for vision', *Proc. Nati. Acad. Scd. USA Chemistry*, 73(7), pp. 2169–2173.
- Matsuno-Yagi, A. and Mukohata, Y. (1977) 'Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78(1), pp. 237–243. doi: 10.1016/0006-291X(77)91245-1.
- McCoy, A. J. *et al.* (2007) 'Phaser crystallographic software', *Journal of Applied Crystallography*. International Union of Crystallography, 40(4), pp. 658–674. doi: 10.1107/S0021889807021206.
- Misra, S. *et al.* (1997) 'Mutation of Arginine 134 to Lysine Alters the pK<sub>s</sub> of Key Groups Involved in Proton Pumping by Bacteriorhodopsin', *Photochemistry and Photobiology*, 66(6), pp. 774–783.
- Mitchell, B. G. *et al.* (2011) 'Ocean biomass and macronutrient of phytoplankton Light limitation in the Southern Ocean utilization', *Limnology and Oceanography*, 36(8), pp. 1662–1677.
- Mogi, T. *et al.* (1987) 'Bacteriorhodopsin mutants containing single tyrosine to phenylalanine substitutions are all active in proton translocation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16).
- Mogi, T., Marti, T. and Khorana, H. G. (1989) 'Structure-Function Studies on Bacteriorhodopsin IX. SUBSTITUTIONS OF TRYPTOPHAN RESIDUES AFFECT PROTEIN-RETINAL INTERACTIONS IN BACTERIORHODOPSIN', *The Journal of Biological Chemistry*, 264(24), pp. 14197–14201.
- Monera, O. D. *et al.* (1995) 'Relationship of sidechain hydrophobicity and  $\alpha$ -helical propensity on the stability of the single-stranded amphipathic  $\alpha$ -helix', *Journal of Peptide Science*, 1(5), pp. 319–329. doi: 10.1002/psc.310010507.
- Mullis, K. and Faloona, F. A. (1987) 'Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction', in *Methods in Enzymology*, pp. 335–350. doi: doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6.
- Murata, Y. *et al.* (2005) 'Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor', *Nature*, 435(7046), pp. 1239–1243. doi: 10.1038/nature03650.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997) 'Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 53(3), pp. 240–255. doi: 10.1107/S0907444996012255.
- Nachliel, E. *et al.* (2002) 'Proton transfer dynamics on the surface of the late M state of bacteriorhodopsin.', *Biophysical Journal*. The Biophysical Society, 83(1), pp. 416–26. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75179-5.
- Nagel, G. *et al.* (1995) 'Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H<sup>+</sup> pumping', *FEBS Letters*, 377(2), pp. 263–266. doi: 10.1016/0014-5793(95)01356-3.
- Nagel, G. *et al.* (2002) 'Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae', *Science*, 296(5577), pp. 2395–2398. doi: 10.1126/science.1072068.
- Nagel, G. *et al.* (2003) 'Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), pp. 13940–13945. doi: 10.1073/pnas.1936192100.

- Nagel, G. *et al.* (2005) 'Light Activation of Channelrhodopsin-2 in Excitable Cells of *Caenorhabditis elegans* Triggers Rapid Behavioral Responses', *Current Biology*, 15(24), pp. 2279–2284. doi: 10.1016/j.cub.2005.11.032.
- Nakanishi, K. *et al.* (1980) 'An external point-charge model for bacteriorhodopsin to account for its purple color', *Journal of the American Chemical Society*, 102(27), pp. 7945–7947. doi: 10.1021/ja00547a028.
- Nango, E. *et al.* (2016) 'A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin', *Science*, 354(6319), pp. 1552–1557. doi: 10.1126/science.aah3497.
- Nathans, J., Thomas, D. and Hogness, D. S. (1985) 'Molecular Genetics of Human Color Vision : The Genes Encoding Blue, Green, and Red Pigments', *Science*, 86(1984), pp. 193–202.
- Nayyar, N. *et al.* (2017) 'Quantitative proteomics of Sf21 cells during Baculovirus infection reveals progressive host proteome changes and its regulation by viral miRNA', *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-017-10787-z.
- Niho, A. *et al.* (2017) 'Demonstration of a Light-Driven SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Transporter and Its Spectroscopic Characteristics', *Journal of the American Chemical Society*, 139(12), pp. 4376–4389. doi: 10.1021/jacs.6b12139.
- Nogly, P. *et al.* (2018) 'Retinal isomerization in bacteriorhodopsin captured by a femtosecond x-ray laser', *Science*, 94(June), p. eaat0094. doi: 10.1126/science.aat0094.
- Nuss, M. *et al.* (1985) 'Femtosecond Spectroscopy of the First Events of the Photochemical Cycle in Bacteriorhodopsin', *Chem. Phys. Lett.*, 117(1), p. 1.
- Oesterhelt, D. *et al.* (1986) 'Trans-cis isomerization of retinal and a mechanism for ion translocation in halorhodopsin', *European Biophysics Journal*, 14(2), pp. 123–129. doi: 10.1007/BF00263069.
- Oesterhelt, D. (1998) 'The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea', *Current Opinion in Structural Biology*, 8(4), pp. 489–500. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80128-0.
- Oesterhelt, D., Meentzen, M. and Schuhmann, L. (1973) 'Reversible Dissociation of the Purple Complex in Bacteriorhodopsin and Identification of 13-cis and all-trans-Retinal as its Chromophores', *European Journal of Biochemistry*, 40(2), pp. 453–463. doi: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb03214.x.
- Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1971) 'Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*', *Nature New Biology*, 233(39), pp. 149–152. doi: 10.1038/newbio233149a0.
- Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1973) 'Functions of a New Photoreceptor Membrane', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(10), pp. 2853–2857. doi: 10.1073/pnas.70.10.2853.
- Ohtani, H. *et al.* (1995) 'Fluorescence spectra of bacteriorhodopsin and the intermediates O and Q at room temperature', *FEBS Letters*, 359(1), pp. 65–68. doi: 10.1016/0014-5793(94)01440-C.
- Ohtani, H. *et al.* (1999) 'Picosecond-millisecond dual-time-base spectroscopy of fluorescent photointermediates formed in the purple membrane of *Halobacterium halobium*', *Chemical Physics Letters*, 299(6), pp. 571–575. doi: 10.1016/S0009-2614(98)01308-6.
- Ormos, P., Dancsházy, Z. and Keszthelyi, L. (1980) 'Electric response of a back photoreaction in the bacteriorhodopsin photocycle', *Biophysical Journal*, 31(2), pp. 207–213. doi:

10.1016/S0006-3495(80)85051-X.

Otto, H. *et al.* (1990) 'Substitution of amino acids Asp-85, Asp-212, and Arg-82 in bacteriorhodopsin affects the proton release phase of the pump and the pK of the Schiff base.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(3), pp. 1018–1022. doi: 10.1073/pnas.87.3.1018.

Patzelt, H. *et al.* (2002) 'The structures of the active center in dark-adapted bacteriorhodopsin by solution-state NMR spectroscopy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), pp. 9765–9770. doi: 10.1073/pnas.132253899.

Pei, J., Kim, B. H. and Grishin, N. V. (2008) 'PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments', *Nucleic Acids Research*, 36(7), pp. 2295–2300. doi: 10.1093/nar/gkn072.

Peng, H. *et al.* (2016) 'Transcriptome analysis reveals global regulation in response to CO<sub>2</sub> supplementation in oleaginous microalga *Coccomyxa subellipsoidea* C-169', *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 9(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/s13068-016-0571-5.

Petkova, A. T. *et al.* (1999) 'Arginine activity in the proton-motive photocycle of bacteriorhodopsin: Solid-state nmr studies of the wild-type and D85N proteins', *Biochemistry*, 38(5), pp. 1562–1572. doi: 10.1021/bi981968z.

Piatkevich, K. D. *et al.* (2018) 'A robotic multidimensional directed evolution approach applied to fluorescent voltage reporters', *Nature Chemical Biology*. Springer US, 14(4), pp. 352–360. doi: 10.1038/s41589-018-0004-9.

Polland, H.-J. *et al.* (1986) 'Early Picosecond Events in the Photocycle of Bacteriorhodopsin', *Biophysical Journal*, 49(3), pp. 651–662. doi: 10.1016/S0006-3495(86)83692-X.

Popp, A. *et al.* (1993) 'Photochemical conversion of the O-intermediate to 9-cis-retinal-containing products in bacteriorhodopsin films', *Biophysical Journal*, 65(4), pp. 1449–1459. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81214-1.

Prigge, M. *et al.* (2012) 'Color-tuned Channelrhodopsins for Multiwavelength Optogenetics', *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), pp. 31804–31812. doi: 10.1074/jbc.M112.391185.

Rajan, S. *et al.* (2000) 'TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. An extracellular histidine as pH sensor', *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), pp. 16650–16657. doi: 10.1074/jbc.M000030200.

Ran, T. *et al.* (2013) 'Cross-protomer interaction with the photoactive site in oligomeric proteorhodopsin complexes', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(10), pp. 1965–1980. doi: 10.1107/S0907444913017575.

Ranjan, P. and Kateriya, S. (2018) 'Localization and dimer stability of a newly identified microbial rhodopsin from a polar, non-motile green algae', *BMC Research Notes*. BioMed Central, 11(1), p. 65. doi: 10.1186/s13104-018-3181-4.

Ren, L. *et al.* (2001) 'Molecular mechanism of spectral tuning in sensory rhodopsin II', *Biochemistry*, 40(46), pp. 13906–13914. doi: 10.1021/bi0116487.

Richter, H.-T., Brown, L. S., *et al.* (1996) 'A Linkage of the pK<sub>a</sub>'s of asp-85 and glu-204 Forms Part of the Reprotonation Switch of Bacteriorhodopsin', *Biochemistry*, 35(13), pp. 4054–4062. doi: 10.1021/bi952883q.

Richter, H.-T., Needleman, R., *et al.* (1996) 'Relationship of Retinal Configuration and Internal Proton Transfer at the End of the Bacteriorhodopsin Photocycle', *Biochemistry*, 35(48), pp. 15461–15466. doi: 10.1021/bi9612430.

- Riesle, J. *et al.* (1996) 'D38 is an essential part of the proton translocation pathway in bacteriorhodopsin', *Biochemistry*, 35(21), pp. 6635–6643. doi: 10.1021/bi9600456.
- Rost, B. R. *et al.* (2015) 'Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes', *Nature Neuroscience*, 18(12), pp. 1845–1852. doi: 10.1038/nn.4161.
- Rostkowski, M. *et al.* (2011) 'Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA', *BMC Structural Biology*, 11(Cc). doi: 10.1186/1472-6807-11-6.
- Rouhani, S. *et al.* (2001) 'Crystal structure of the D85S mutant of bacteriorhodopsin: Model of an O-like photocycle intermediate', *Journal of Molecular Biology*, 313(3), pp. 615–628. doi: 10.1006/jmbi.2001.5066.
- Rouso, I. *et al.* (1995) 'pKa of the Protonated Schiff Base and Aspartic 85 in the Bacteriorhodopsin Binding Site Is Controlled by a Specific Geometry between the Two Residues', *Biochemistry*, 34(37), pp. 12059–12065. doi: 10.1021/bi00037a049.
- Royant, a *et al.* (2000) 'Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin.', *Nature*, 406(August), pp. 645–648. doi: 10.1038/35020599.
- Saiki, R. *et al.* (1988) 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase', *Science*, 239(4839), pp. 487–491. doi: 10.1126/science.239.4839.487.
- Sasaki, J. *et al.* (1995) 'Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump', *Science*, 269(5220), pp. 73–75. doi: 10.1126/science.7604281.
- Sass, H. J. *et al.* (2000) 'Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin', *Nature*, 406(6796), pp. 649–653. doi: 10.1038/35020607.
- Sattig, T. *et al.* (2013) 'Light-induced movement of the transmembrane Helix B in Channelrhodopsin-2', *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(37), pp. 9705–9708. doi: 10.1002/anie.201301698.
- Scharnagl, C. and Fischer, S. F. (1996) 'Conformational flexibility of arginine-82 as source for the heterogeneous and pH-dependent kinetics of the primary proton transfer step in the bacteriorhodopsin photocycle: An electrostatic model', *Chemical Physics*, 212(1 SPEC. ISSUE), pp. 231–246. doi: 10.1016/S0301-0104(96)00192-9.
- Scheib, U. *et al.* (2015) 'The rhodopsin-guanylyl cyclase of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* enables fast optical control of cGMP signaling', *Science Signaling*, 8(389), p. rs8-rs8. doi: 10.1126/scisignal.aab0611.
- Schenkl, S. *et al.* (2005) 'Probing the Ultrafast Charge Translocation of Photoexcited Retinal in Bacteriorhodopsin', *Science*, 309(5736), pp. 917–920. doi: 10.1126/science.1111482.
- Schenkl, S. *et al.* (2006) 'Insights into excited-state and isomerization dynamics of bacteriorhodopsin from ultrafast transient UV absorption', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(11), pp. 4101–4106. doi: 10.1073/pnas.0506303103.
- Scherrer, P. *et al.* (1989) 'Retinal Isomer Ratio in Dark-Adapted Purple Membrane and Bacteriorhodopsin Monomers', *Biochemistry*, 28(2), pp. 829–834. doi: 10.1021/bi00428a063.
- Schneider, F., Grimm, C. and Hegemann, P. (2015) 'Biophysics of Channelrhodopsin', *Annual Review of Biophysics*, 44(1), pp. 167–186. doi: 10.1146/annurev-biophys-060414-034014.
- Schobert, B. *et al.* (2002) 'Crystallographic Structure of the K Intermediate of Bacteriorhodopsin: Conservation of Free Energy after Photoisomerization of the Retinal', *Journal of Molecular Biology*, 321(4), pp. 715–726. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00681-2.

- Schobert, B., Brown, L. S. and Lanyi, J. K. (2003) 'Crystallographic Structures of the M and N Intermediates of Bacteriorhodopsin: Assembly of a Hydrogen-bonded Chain of Water Molecules Between Asp-96 and the Retinal Schiff Base', *Journal of Molecular Biology*, 330(3), pp. 553–570. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00576-X.
- Sharma, A. K. *et al.* (2008) 'Actinorhodopsins: proteorhodopsin-like gene sequences found predominantly in non-marine environments', *Environmental Microbiology*, 10(4), pp. 1039–1056. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01525.x.
- Shevchenko, V. *et al.* (2017) 'Inward H + pump xenorhodopsin: Mechanism and alternative optogenetic approach', *Science Advances*, 3(9), p. e1603187. doi: 10.1126/sciadv.1603187.
- Siebert, F., Mäntele, W. and Kreutz, W. (1982) 'Evidence for the protonation of two internal carboxylic groups during the photocycle of bacteriorhodopsin. Investigation of kinetic infrared spectroscopy', *FEBS Letters*, 141(1), pp. 82–87. doi: 10.1016/0014-5793(82)80021-5.
- Sineshchekov, O. A. *et al.* (2017) 'Bacteriorhodopsin-like channelrhodopsins: Alternative mechanism for control of cation conductance', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(45), pp. E9512–E9519. doi: 10.1073/pnas.1710702114.
- Sineshchekov, O. A., Jung, K.-H. and Spudich, J. L. (2002) 'Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), pp. 8689–8694. doi: 10.1073/pnas.122243399.
- Smith, S. O. *et al.* (1983) 'Chromophore Structure in Bacteriorhodopsin's O640 Photointermediate', *Biochemistry*, 22, pp. 6141–6148.
- Smith, S. O., Lugtenburg, J. and Mathies, R. A. (1985) 'Determination of retinal chromophore structure in bacteriorhodopsin with resonance Raman spectroscopy', *The Journal of Membrane Biology*, 85(2), pp. 95–109. doi: 10.1007/BF01871263.
- Snellenburg, J. *et al.* (2012) 'Glotaran: A Java-based graphical user interface for the R package TIMP', *Journal of Statistical Software*, 49(3), p.
- Stehfest, K. and Hegemann, P. (2010) 'Evolution of the channelrhodopsin photocycle model', *ChemPhysChem*, 11(6), pp. 1120–1126. doi: 10.1002/cphc.200900980.
- Stern, L. J. and Khorana, H. G. (1989) 'Structure-Function Studies on Bacteriorhodopsin X. INDIVIDUAL SUBSTITUTIONS OF ARGININE RESIDUES BY GLUTAMINE AFFECT CHROMOPHORE FORMATION, PHOTOCYCLE, AND PROTON TRANSLOCATION', *The Journal of Biological Chemistry*, 264(24), pp. 14202–14208.
- Stoeckenius, W., Lozier, R. H. and Bogomolni, R. A. (1979) 'Bacteriorhodopsin and the Purple Membrane of Halobacteria', *Biochimica et Biophysica Acta*, 505, pp. 215–278. doi: doi.org/10.1016/0304-4173(79)90006-5.
- Van Stokkum, I. H. M., Larsen, D. S. and Van Grondelle, R. (2004) 'Global and target analysis of time-resolved spectra', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1657(2–3), pp. 82–104. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.04.011.
- Sugiyama, Y. and Mukohata, Y. (1984) 'Isolation and characterization of halorhodopsin from *Halobacterium halobium*', *J Biochem*, 96(2), pp. 413–420.
- Szárász, S., Oesterhelt, D. and Ormos, P. (1994) 'pH-induced structural changes in bacteriorhodopsin studied by Fourier transform infrared spectroscopy', *Biophysical Journal*, 67(4), pp. 1706–1712. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80644-7.
- Takahashi, T. *et al.* (1985) 'Evidence that the long-lifetime photointermediate of s-rhodopsin

is a receptor for negative phototaxis in halobacterium halobium', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 127(1), pp. 99–105. doi: 10.1016/S0006-291X(85)80131-5.

Tallent, J. R. *et al.* (1998) 'Photochemistry in dried polymer films incorporating the deionized blue membrane form of bacteriorhodopsin', *Biophysical Journal*. Elsevier, 75(4), pp. 1619–1634. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77605-2.

Tamogami, J. *et al.* (2017) 'Existence of two O-like intermediates in the photocycle of Acetabularia rhodopsin II, a light-driven proton pump from a marine alga.', *Biophysics and physicobiology*. The Biophysical Society of Japan, 14, pp. 49–55. doi: 10.2142/biophysico.14.0\_49.

Tavan, P., Schulten, K. and Oesterhelt, D. (1985) 'The Effect of Protonation and Electrical Interactions on the Stereochemistry of Retinal Schiff Bases', *Biophysical Journal*, 47(3), pp. 415–430. doi: 10.1016/S0006-3495(85)83933-3.

Terakita, A. (2005) 'The opsins', *Genome Biology*, 6(3), p. 213. doi: 10.1186/gb-2005-6-3-213.

Tilzer, M. M. *et al.* (1986) 'Light-temperature interactions in the control of photosynthesis in Antarctic phytoplankton', *Polar Biology*, 5(2), pp. 105–111. doi: 10.1007/BF00443382.

Tkatch, T. *et al.* (2017) 'Optogenetic control of mitochondrial metabolism and Ca<sup>2+</sup> signaling by mitochondria-targeted opsins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201703623. doi: 10.1073/pnas.1703623114.

Tóth-Boconádi, R., Keszthelyi, L. and Stoeckenius, W. (2003) 'Late Events in the Photocycle of Bacteriorhodopsin Mutant L93A', *Biophysical Journal*, 84(June), pp. 3848–3856.

Tsunoda, S. P. *et al.* (2006) 'H<sup>+</sup>-Pumping Rhodopsin from the Marine Alga Acetabularia', *Biophysical Journal*. Cell Press, 91(4), pp. 1471–1479. doi: 10.1529/BIOPHYSJ.106.086421.

Ugalde, J. A. *et al.* (2011) 'Xenorhodopsins, an enigmatic new class of microbial rhodopsins horizontally transferred between archaea and bacteria', *Biology Direct*, 6(1), p. 52. doi: 10.1186/1745-6150-6-52.

Vaguine, A. A., Richelle, J. and Wodak, S. J. (1999) 'SFCHECK: A unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 55(1), pp. 191–205. doi: 10.1107/S0907444998006684.

Varo, G. *et al.* (1995) 'Light-Driven Chloride Ion Transport by Halorhodopsin from Natronobacterium pharaonis. I. The Photochemical Cycle', *Biochemistry*, 34(44), pp. 14490–14499. doi: 10.1021/bi00044a027.

Váró, G. and Lanyi, J. K. (1991) 'Thermodynamics and Energy Coupling in the Bacteriorhodopsin Photocycle', *Biochemistry*, 30(20), pp. 5016–5022. doi: 10.1021/bi00234a025.

Verhoefen, M. K. *et al.* (2010) 'The photocycle of channelrhodopsin-2: Ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps', *ChemPhysChem*, 11(14), pp. 3113–3122. doi: 10.1002/cphc.201000181.

Vierock, J. *et al.* (2017) 'Molecular determinants of proton selectivity and gating in the red-light activated channelrhodopsin Chrimson', *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-017-09600-8.

Vogele, L. *et al.* (2004) 'Anabaena Sensory Rhodopsin: A Photochromic Color Sensor at 2.0 Å', *Science*, 306(5700), pp. 1390–1393. doi: 10.1126/science.1103943.

Vogt, A. *et al.* (2015) 'Conversion of a light-driven proton pump into a light-gated ion

- channel.', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 5(16450), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep16450.
- Vogt, A. (2017) *Elektrophysiologische Untersuchung des gerichteten Protonentransportes in mikrobiellen Rhodopsinen*, Dissertation. Humboldt Universität zu Berlin.
- Vogt, A., Wietek, J. and Hegemann, P. (2013) 'Gloeobacter Rhodopsin, Limitation of Proton Pumping at High Electrochemical Load', *Biophysical Journal*, 105(9), pp. 2055–2063. doi: 10.1016/j.bpj.2013.08.031.
- Volkov, O. *et al.* (2017) 'Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2', *Science*, 358(6366), p. eaan8862. doi: 10.1126/science.aan8862.
- Wada, T. *et al.* (2011) 'Crystal Structure of the Eukaryotic Light-Driven Proton-Pumping Rhodopsin, *Acetabularia* Rhodopsin II, from Marine Alga', *Journal of Molecular Biology*, 411(5), pp. 986–998. doi: 10.1016/j.jmb.2011.06.028.
- Wang, T. *et al.* (2013) 'Deprotonation of D96 in Bacteriorhodopsin Opens the Proton Uptake Pathway', *Structure*. Elsevier Ltd, 21(2), pp. 290–297. doi: 10.1016/j.str.2012.12.018.
- Wang, T. *et al.* (2014) 'Stable closure of the cytoplasmic half-channel is required for efficient proton transport at physiological membrane potentials in the bacteriorhodopsin catalytic cycle', *Biochemistry*, 53(14), pp. 2380–2390. doi: 10.1021/bi4013808.
- Wang, T., Facciotti, M. T. and Duan, Y. (2013) 'Schiff Base Switch II Precedes the Retinal Thermal Isomerization in the Photocycle of Bacteriorhodopsin', *PLoS ONE*, 8(7). doi: 10.1371/journal.pone.0069882.
- Wang, W. *et al.* (2012) 'Tuning the Electronic Absorption of Protein-Embedded All-trans-Retinal', *Science*, 338(6112), pp. 1340–1343. doi: 10.1126/science.1226135.
- Weidlich, O. *et al.* (1996) 'Steric Interaction between the 9-Methyl Group of the Retinal and Tryptophan 182 Controls 13- cis to all - trans Reisomerization and Proton Uptake in the Bacteriorhodopsin Photocycle ', *Biochemistry*, 35(33), pp. 10807–10814. doi: 10.1021/bi960780h.
- Wickstrand, C. *et al.* (2015) 'Bacteriorhodopsin: Would the real structural intermediates please stand up?', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., 1850(3), pp. 536–553. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.021.
- Wietek, J. *et al.* (2014) 'Conversion of Channelrhodopsin into a Light-Gated Chloride Channel', *Science*, 344(6182), pp. 409–412. doi: 10.1126/science.1249375.
- Wietek, J. *et al.* (2015) 'An improved chloride-conducting channelrhodopsin for light-induced inhibition of neuronal activity in vivo', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(April), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep14807.
- Wietek, J. *et al.* (2016) 'Identification of a Natural Green Light Absorbing Chloride Conducting Channelrhodopsin from *Proteomonas sulcata*', *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), pp. 4121–4127. doi: 10.1074/jbc.M115.699637.
- Winn, M. D., Isupov, M. N. and Murshudov, G. N. (2001) 'Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 57(1), pp. 122–133. doi: 10.1107/S09074444900014736.
- Wolf, S. *et al.* (2010) 'Directional Proton Transfer in Membrane Proteins Achieved through Protonated Protein-Bound Water Molecules: A Proton Diode', *Angewandte Chemie International Edition*. WILEY-VCH Verlag, 49(38), pp. 6889–6893. doi:



10.1002/anie.201001243.

Yamauchi, Y. *et al.* (2017) 'Molecular properties of a DTD channelrhodopsin from *Guillardia theta*', *Biophysics and Physicobiology*, 14, pp. 57–66. doi: 10.2142/biophysico.14.0.

Yoshida, K. *et al.* (2017) 'A unique choanoflagellate enzyme rhodopsin exhibits light-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity', *Journal of Biological Chemistry*, 292(18), pp. 7531–7541. doi: 10.1074/jbc.M117.775569.

Yoshizawa, S. *et al.* (2014) 'Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(18), pp. 6732–6737. doi: 10.1073/pnas.1403051111.

Zaccai, G. (2000) 'How Soft Is a Protein? A Protein Dynamics Force Constant Measured by Neutron Scattering', *Science*, 288(5471), pp. 1604–1607. doi: 10.1126/science.288.5471.1604.

Zhang, F. *et al.* (2006) 'Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells', *Nature Methods*, 3(10), pp. 785–792. doi: 10.1038/nmeth936.

Zhang, F. *et al.* (2007) 'Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems', *Nature Reviews Neuroscience*, 8(8), pp. 577–581. doi: 10.1038/nrn2192.

Zhang, F. *et al.* (2011) 'The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools', *Cell*, 147(7), pp. 1446–1457. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.004.

Zhang, J. *et al.* (2013) 'Crystal structure of deltarhodopsin-3 from *Haloterrigena thermotolerans*', *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 81(9), pp. 1585–1592. doi: 10.1002/prot.24316.

Zimanyi, L. *et al.* (1992) 'Pathways of proton release in the bacteriorhodopsin photocycle', *Biochemistry*, 31(36), pp. 8535–8543. doi: 10.1021/bi00151a022.

Zimányi, L., Keszthelyi, L. and Lanyi, J. K. (1989) 'Transient Spectroscopy of Bacterial Rhodopsins with an Optical Multichannel Analyzer. 1. Comparison of the Photocycles of Bacteriorhodopsin and Halorhodopsin', *Biochemistry*, 28, pp. 5165–5172.

# Publikationsliste

Teile dieser Arbeit sind für die Veröffentlichung geplant:

**Roman Fudim\***, Michal Szczepek\*, Johannes Vierock, Arend Vogt, Andrea Schmidt, Paul Fischer, Franz Bartl, Patrick Scheerer und Peter Hegemann, „Design of a light-gated proton channel based on the high-resolution structure of *Coccomyxa rhodopsin*“

\*Geteilte Erstautorenschaft

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf Konferenzen vorgestellt:

**Roman Fudim**, Arend Vogt und Peter Hegemann, „*Spectroscopic Investigation of the Protonpump CsR and its Leaky Derivatives*“, *61st Annual Meeting of the Biophysical Society*, New Orleans, Louisiana, Vereinigten Staaten von Amerika, **Poster**

**Roman Fudim**, Michael Szczepek, Arend Vogt, Johannes Vierock, Patrick Scheerer und Peter Hegemann, „*Structure Guided Transformation of a Light-activated Proton Pump into a Proton Channel*“, *Emerging Concepts in Ion Channel Biophysics*, Mexico City, Mexico, **Poster**

Strukturkoordinaten:

Die im Rahmen dieser Arbeit gelöste Kristallstruktur des CsR ist unter dem Schlüssel 6GYH in der *Protein Data Bank* hinterlegt.

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Isomerisierungsmechanismus mikrobieller und tierischer Rhodopsine.....	2
<b>Abbildung 2</b>	Schematische Übersicht bekannter mikrobieller Rhodopsine .....	4
<b>Abbildung 3</b>	Vereinfachtes Modell des Photozyklus von BR .....	7
<b>Abbildung 4</b>	Ansicht eines Monomers aus der BR-Kristallstruktur .....	12
<b>Abbildung 5</b>	Identifikationsmotive lichtgetriebener Ionenpumpen.....	16
<b>Abbildung 6</b>	Sequenzvergleich von CsR mit anderen lichtgetriebenen Protonenpumpen.....	21
<b>Abbildung 7</b>	Expression und Aufreinigung von CsR .....	47
<b>Abbildung 8</b>	Übersicht verschiedener CsR-Kristalle nach Dampfphasen-Diffusion.....	48
<b>Abbildung 9</b>	CsR-Kristall aus LCP und zugehöriges Diffraktionsbild.....	49
<b>Abbildung 10</b>	Generelle Kristallarchitektur von CsR.....	50
<b>Abbildung 11</b>	$C_{\alpha}$ -Angleichungen von CsR mit AR-2 und BR .....	51
<b>Abbildung 12</b>	Detaillierte Darstellung des Gegenionkomplexes in CsR. ....	53
<b>Abbildung 13</b>	Schmelztemperaturen von Y57K und R83Q, sowie Absorptionsspektrum von rekombinantem Y57K.....	54
<b>Abbildung 14</b>	H-Brückennetzwerk in der extrazellulären Hälfte von CsR.....	57
<b>Abbildung 15</b>	Retinalbindetasche in CsR.....	60
<b>Abbildung 16</b>	Zytoplasmatische Hälfte von CsR.....	63
<b>Abbildung 17</b>	Oberflächenladungen von CsR .....	66
<b>Abbildung 18</b>	Stationäre Absorptionsspektren von CsR.....	67
<b>Abbildung 19</b>	pH-Titration von CsR-WT.....	68
<b>Abbildung 20</b>	Blitzlicht-Photolysemessungen an CsR-WT.....	70
<b>Abbildung 21</b>	EADS und berechnete Absolutspektren verschiedener WT-Intermediate.....	73
<b>Abbildung 22</b>	Stationäre Absorptionsspektren und pH-Titration von R83Q.....	75
<b>Abbildung 23</b>	Blitzlicht-Photolysemessungen und berechnete Absolutspektren von R83Q..	77
<b>Abbildung 24</b>	Stationäre Absorptionsspektren und pH-Titration von R77Q .....	79
<b>Abbildung 25</b>	Blitzlicht-Photolysemessungen und berechnete Absolutspektren von R77Q..	81
<b>Abbildung 26</b>	Stationäre Absorptionsspektren und pH-Titration von A56H.....	83
<b>Abbildung 27</b>	Blitzlicht-Photolysemessungen und berechnete Absolutspektren von A56H ..	85
<b>Abbildung 28</b>	Stationäre Absorptionsspektren und pH-Titration von A56H.....	87
<b>Abbildung 29</b>	Blitzlicht-Photolysemessungen und berechnete Absolutspektren von S141G..	88
<b>Abbildung 30</b>	Absorptionsspektren und Blitzlicht-Photolysemessungen von Y14F. ....	90
<b>Abbildung 31</b>	Elektrophysiologische Untersuchungen an CsR-WT und Y14-Mutanten.....	93
<b>Abbildung 32</b>	Stationäre Absorptionsspektren von Y14K und Y14E .....	95
<b>Abbildung 33</b>	Blitzlicht-Photolysemessungen von Y14E.....	96
<b>Abbildung 34</b>	EADS und daraus berechnete Absolutspektren verschiedener Photozyklus-intermediate von Y14E.....	98
<b>Abbildung 35</b>	Absorptionsspektren von Chlorophyll und CsR.....	100
<b>Abbildung 36</b>	Schematischer Photozyklus von CsR. ....	106
<b>Abbildung 37</b>	Blitzlichtinduzierte elektrophysiologische Untersuchungen von CsR. ....	109
<b>Abbildung 38</b>	Einfluss zytoplasmatischer Reste auf die Reprotonierung der RSB .....	113
<b>Abbildung 39</b>	$C_{\alpha}$ -Überlagerung der CsR- und ChR2-Monomere.....	116
<b>Abbildung 40</b>	Berechnete Kavitäten innerhalb der extrazellulären Hälfte von CsR und anderen lichtgetriebenen Pumpen .....	118
<b>Abbildung 41</b>	$C_{\alpha}$ -Überlagerung der CsR-WT und CsR-Y14E. ....	123
<b>Abbildung 42</b>	Blitzlichtinduzierte elektrophysiologische Untersuchung von Y14E und daraus abgeleitetes Modell zum passiven Protonentransport .....	124
<b>Abbildung 43</b>	Fluoreszenzaufnahme einer mit CsR-eGFP transfizierten ND7/23-Zelle.....	127
<b>Abbildung A1</b>	Detailansicht der Kopplung von R83 und D211 .....	133

<b>Abbildung A2</b> Stationäre Absorptionsspektren von Y138A.....	133
<b>Abbildung A3</b> Stationäre Absorptionsspektren des verkürzten und des Volllängen-Konstruktes von CsR.....	133
<b>Abbildung A4</b> Detailansicht der H-Brücke zwischen S141 und M119.....	134
<b>Abbildung A5</b> Schmelztemperatur von CsR-WT und Y14K .....	134
<b>Abbildung A6</b> Diffraktionsbild eines Y14E Kristalls.....	134

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Übersichtstabelle zu den verwendeten Expressionsvektoren.....	24
<b>Tabelle 2</b> Übersichtstabelle weiterer verwendeter Enzyme.....	25
<b>Tabelle 3</b> Zusammensetzung des PCR-Ansatzes .....	26
<b>Tabelle 4</b> PCR-Temperaturprotokoll. ....	27
<b>Tabelle 5</b> Pipettierschema zum Restriktionsverdau. ....	28
<b>Tabelle 6</b> Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für Kolonie-PCR.....	30
<b>Tabelle 7</b> PCR-Zyklus zur Amplifikation von Bacmid DNS mit Hilfe von Kolonie-PCR.....	31
<b>Tabelle 8</b> Software zur weiterführenden Analyse der Kristallstruktur .....	45
<b>Tabelle 9</b> Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-WT bei pH 5, 7,4 und 9.....	72
<b>Tabelle 10</b> Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-Arg83Gln bei pH 5 und pH 8.....	78
<b>Tabelle 11</b> Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-Arg77Gln bei pH 5 und pH 8.....	82
<b>Tabelle 12</b> Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-Tyr14Phe bei pH 7,4.....	91
<b>Tabelle 13</b> Apparente Zeitkonstanten der EADS von CsR-Tyr14Glu bei pH 5, 7,4 und 9.....	97

---

# Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen, Mitteilungen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den

Roman Fudim

---



# Danksagung